



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y
Geográfica
Unidad de Posgrado

**Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y
virulencia de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin
y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin
sobre un insecto plaga**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctora en Ciencias
Ambientales

AUTOR

Clemencia Oderay MERINO PEÑAFIEL

ASESOR

Jesús Ángel Alejandro CHÁVEZ MACHADO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Merino, C. (2017). *Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin y Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin sobre un insecto plaga*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

0692

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
**FACULTAD DE INGENIERÍA GEOLÓGICA, MINERA, METALÚRGICA Y
GEOGRÁFICA**

UNIDAD DE POSGRADO

«Año del buen servicio al ciudadano»

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

SUSTENTACIÓN PÚBLICA

16(e)
161

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Lima, a los veintinueve días del mes de mayo del 2017, siendo las 11:00 horas, se reúnen los suscritos miembros del JURADO EXAMINADOR DE TESIS, nombrado mediante Dictamen N.º 291/UPG-FIGMMG/2017 del 04 de mayo de 2017, con la finalidad de evaluar la sustentación oral de la siguiente tesis:

TÍTULO

«EFECTO DE LOS SUSTRATOS NUTRITIVOS EN LA PRODUCCIÓN Y VIRULENCIA DE *Beauveria bassiana* (BÁLSAMO) VUILLEMIN Y *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) SOROKIN SOBRE UN INSECTO PLAGA»

Que, presenta la **MG. CLEMENCIA ODERAY MERINO PEÑAFIEL** para optar el **GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**.

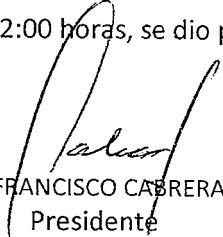
El secretario del Jurado Examinador de la Tesis, analiza el expediente 06322-FIGMMG-2013 del 23 de agosto del 2013, en el marco legal y Estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y cumplió con las etapas de la Directiva para el procedimiento de la elaboración de la tesis para la obtención del Grado de Magister o Doctor (Aprobado por Resolución Directoral 080.EPG.2010).

Luego de la Sustentación de la Tesis, los miembros del Jurado Examinador procedieron a aplicar la escala descrita en el Art. 61 del precitado Reglamento, correspondiéndole al graduando la siguiente calificación:

MUY BUENO (18)

Habiendo sido aprobada la sustentación de la tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES** a la **MG. CLEMENCIA ODERAY MERINO PEÑAFIEL**.

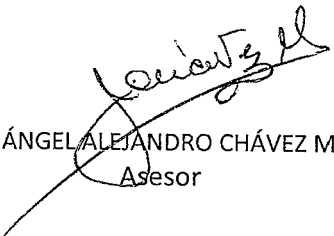
Siendo las 12:00 horas, se dio por concluido al acto académico.


DR. CARLOS FRANCISCO CABRERA CARRANZA
Presidente


DRA. RINA LASTENIA RAMÍREZ MESÍAS
Secretario


DR. PEDRO LUIS CASTELLANOS SÁNCHEZ
Miembro


DRA. SUSANA MONICA GUTIERREZ MORENO
Miembro


DR. JESÚS ÁNGEL ALEJANDRO CHÁVEZ MACHADO
Asesor

DEDICATORIA.

A:

Mis padres: Manuel Antonio y Luz María (QEPD), por ser ejemplo de una suma de valores, fortalezas, luchadores incansables y perseverantes en la vida.

Mi esposo: Rigoberto por su amor, dedicación, paciencia y apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado en esta y otras etapas importantes de mi vida.

Mi hijo: Alejandro que le amo mucho, por ser la razón de mi vida, mi alegría, inspiración, el motor de mi constante superación y por motivarme siempre a crecer y ser cada día mejor.

Mi familia: Hermanos, Edgar y Franklin, hermanas Piedad, Nancy y Sandra, por su amor, apoyo y colaboración.

La autora

AGRADECIMIENTO.

A:

DIOS, ser supremo por el maravilloso hecho de otorgarme la vida, ser mi fuente de sabiduría y origen de esperanza, por permitirme cumplir muchas metas en mi vida y llenarme de bendiciones en todo momento.

La Universidad Estatal de Bolívar por ser parte de mi formación académica.

La Universidad Nacional Mayor de San Marcos, autoridades, docentes y personal administrativo de la Unidad de Posgrado, por acogerme en esta prestigiosa Institución.

Los Doctores Jesús Ángel Chávez Machado, Óscar Rafael Tinoco Gómez, Ph.D Pedro Castellanos y Dra. Susana Gutiérrez, por su amistad, tiempo y guía en el desarrollo de la tesis. Además, la Doctora Rina Ramírez y Doctor Carlos Cabrera Carranza, miembros del jurado examinador.

La Universidad Estatal Amazónica, en la persona del Doctor Julio César Vargas Burgos, Rector, por la prestación del laboratorio de microbiología. Los Doctores Reinaldo Alemán y Naga Raju Maddela. Ph.D, Investigadores-Prometeos por sus valiosas sugerencias, críticas y aportes; además a la Ingeniera Deisy Changoluisa y Doctor Segundo Valle, por su colaboración.

La familia Arellano-Veintemilla y Ogosí-Salvatierra, por su hospitalidad y generosidad. La Máster Myriam Merino Jaramillo. Las Ingenieras Sandra Merino Peñafiel y Dely Landín Chávez. Los Ingenieros Rigoberto Novillo Bastidas y Alejandro Novillo Merino por su valiosa colaboración.

¡Gracias a todas las personas que tributaron en la presente investigación!

La autora

ÍNDICE GENERAL.

	Pág.
PORTADA.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
LISTA DE CUADROS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Situación problemática.....	1
1.2. Formulación del problema.....	5
1.2.1. Problema general.....	5
1.2.2. Problemas específicos.....	5
1.3. Justificación teórica.....	6
1.4. Justificación práctica.....	7
1.5. Objetivos.....	9
1.5.1. Objetivo general.....	9
1.5.2. Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación.	10
2.1.1. Fundamentación filosófica.....	10
2.1.2. Fundamentación Legal.	12
2.2. Antecedentes de la investigación.	12
2.3. Bases teóricas.	17
2.3.1. La agricultura y los insectos plaga.....	17
2.3.2. Plaga agrícola.	18
2.3.2.1. La broca del café de café <i>Hypothenemus hampei</i>	19
Ferrari, 1887.....	

2.3.2.2. Salivazo de la caña de azúcar (<i>Mahanarva andigena</i> . Jacobi).....	23
2.3.3. Manejo integrado de plagas.....	27
2.3.3.1. Control biológico.....	28
2.3.4. Hongos entomopatógenos.....	28
2.3.4.1. Generalidades.	28
2.3.4.2. Distribución y ecología.	30
2.3.4.3. Clasificación y sistemática.	30
2.3.4.4. Patogenicidad.	31
2.3.4.5. Metabolitos insecticidas del hongo entomopatógeno...	33
2.3.4.6. Principales ventajas y desventajas de los hongos entomopatógenos.....	34
2.3.5. <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin 1912.....	35
2.3.5.1. Generalidades.	35
2.3.5.2. Taxonomía de la <i>Beauveria bassiana</i>	36
2.3.5.3. Características morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> ...	36
2.3.5.4. Ciclo de la infección del insecto por <i>B. bassiana</i>	37
2.3.6. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff, 1879) Sorokin.	39
2.3.6.1. Generalidades.	39
2.3.6.2. Taxonomía de <i>M. anisopliae</i>	41
2.3.6.3. Características morfológicas.	41
2.3.6.4. Ciclo de infección del insecto por <i>M. anisopliae</i>	42
2.3.6.5. Toxinas sintetizadas por <i>M. anisopliae</i>	43
2.3.7. Medios de cultivo para aislar hongos entomopatógenos...	44
2.3.7.1. Agar - Agar.	45
2.3.7.2. Sabouraud dextrosa Agar.	45
2.3.7.3. Papa dextrosa agar.	45
2.3.7.4. Medio de cultivo de mantenimiento de la <i>B. bassiana</i> ...	45
2.3.7.5. Medio de cultivo líquido para inocular a sustratos sólidos.....	45
2.3.8. Sustratos sólidos para la producción en masa de los hongos entomopatógenos.	46
2.3.8.1. Sustratos sólidos arroz y maíz.....	47

2.3.9. Suplementos nutritivos.	48
2.3.9.1. Melaza.	49
2.3.9.2. Harina de amaranto (<i>Amaranthus duvius</i> Mart. Ex Thell).....	50
2.3.9.3. Harina de soya (<i>Glycine max</i> L.).	50
2.3.9.4. Leche entera en polvo.	51
2.3.9.5. Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Meyen ex E.C. Hansen).	51
2.3.10. Producción en masa de los hongos entomopatógenos...	52
2.3.10.1. Generalidades.	52
2.3.10.2. Métodos de producción en masa...	53
2.3.10.3. Etapas de producción en masa.	54
2.3.11. Determinación fisiológica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> de la producción en masa.....	55
2.3.11.1. Técnicas de control de calidad microbiológica.	55
2.3.12. Pruebas biológicas o bioensayos.	55
2.3.12.1. Patogenicidad y virulencia.....	56
2.3.12.2. Parámetros de evaluación de la susceptibilidad a bioinsecticidas.....	57
2.3.12.3. Métodos para la estimación de la concentración y tiempo letal 50.....	58
2.3.13. Definiciones básicas en el control microbiano.	58
CAPITULO 3: METODOLOGÍA.....	62
3.1. Ubicación geográfica y climática del experimento.	62
3.2. Tipo y diseño de la investigación.	63
3.2.1. Tipo de investigación.	63
3.2.2. Diseño de la investigación	63
3.3. Unidad de análisis.	65
3.4. Población de estudio.....	65
3.5. Tamaño de la muestra.	65
3.6. Selección de la muestra.	66
3.7. Materiales.	66
3.7.1. Materiales de laboratorio.	66

3.7.2. Material fúngico.	66
3.8. Técnicas de recolección de datos.	67
3.8.1. Fase de campo.	68
3.8.1.1. Bioprospección de las fincas en estudio.	68
3.8.1.2. Recolección de especímenes en el campo.	69
3.8.2. Fase de laboratorio.	70
3.8.2.1. Desinfección superficial de los especímenes.....	70
3.8.2.2. Siembra del hongo del género <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i>	70
3.8.2.3. Cultivos monospóricos, preparación de suspensión y siembra.....	70
3.8.2.4. Determinación morfológica de hongos del género <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i>	71
3.8.2.5. Identificación de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos.	72
3.8.2.6. Conservación de las cepas nativas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	72
3.8.2.7. Técnicas de control de la calidad de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	72
3.8.2.8. Producción en masa de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos.....	73
3.8.2.9. Determinación fisiológica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en el producto terminado (bioproducto).....	75
3.8.2.10. Bioensayo de la patogenicidad de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos en el laboratorio.	77
3.8.2.11. Bioensayo de la virulencia de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos en el laboratorio.	78
3.9. Variables.	79
3.9.1. Variable independiente.....	79
3.9.2. Variables dependientes.....	79
3.9.3. Variables intervinientes.....	79
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados.....	80

4.1.1. Determinación morfológica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativas.....	80
4.1.1.1. Aislamiento de hongos entomopatógenos nativos...	80
4.1.1.2. Descripción macroscópica de las colonias de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	81
4.1.1.3. Descripción microscópica del hongo entomopatógeno <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	84
4.1.2. Identificación de la especie <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin nativas.....	89
4.1.3. Determinación del porcentaje de la pureza de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	90
4.1.4. Determinación <i>in vitro</i> de la producción de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en la mezcla de arroz y maíz.	92
4.1.4.1. Conservación de las cepas puras de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> para la producción <i>in vitro</i>	92
4.1.4.2. Producción <i>in vitro</i> de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en la mezcla de arroz y maíz.....	92
4.1.5. Determinación crecimiento radial micelial de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> de la producción <i>in vitro</i> en la mezcla de arroz y maíz.....	96
4.1.5.1. Determinación del análisis de varianza del crecimiento radial entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	97
4.1.6. Determinación de la producción en masa de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos en los sustratos nutritivos.....	99
4.1.6.1. Análisis de varianza de la producción en masa entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	101
4.1.6.2. Comparación múltiple de medias de la producción en masa entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	102
4.1.7. Determinación fisiológica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> de la producción en masa.....	103
4.1.7.1. Determinación del porcentaje de germinación de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	103

4.1.7.2. Crecimiento radial micelial de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en la producción en masa.	106
4.1.8. Determinación biológica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos.....	109
4.1.8.1. Patogenicidad de <i>B. bassiana</i> sobre <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i> por <i>M. anisopliae</i> en el laboratorio.	109
4.1.8.2. Determinación de la virulencia de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> sobre <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i> a nivel de laboratorio...	113
4.1.8.3. Determinación de la concentración letal (50) y tiempo letal (50) de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos sobre <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i>	117
4.1.9. Verificación de las hipótesis.....	123
4.1.9.1. Verificación de la hipótesis general.....	123
4.1.9.2. Verificación de las hipótesis específicas.....	124
CONCLUSIONES.....	129
RECOMENDACIONES.....	131
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
ANEXOS.....	158

LISTA DE CUADROS.

	Pág.
Cuadro 1. Taxonomía de la <i>H. hampei</i>	20
Cuadro 2. Taxonomía de la <i>M. andigena</i> Jacobi.....	24
Cuadro 3. Taxonomía de la <i>B. bassiana</i>	36
Cuadro 4. Taxonomía del <i>M. anisopliae</i>	41
Cuadro 5. Composición química del arroz y maíz.....	48
Cuadro 6. Composición química de la melaza.....	49
Cuadro 7. Composición química de la semilla de amaranto/100 g de la parte comestible y en base seca.....	50
Cuadro 8. Composición química en base seca de la harina de soya...	51
Cuadro 9. Composición química de la leche en polvo entera.....	51
Cuadro 10. Componentes típicos de las levaduras.....	52
Cuadro 11. Contenido de los aminoácidos en el extracto de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
Cuadro 12. Ubicación geográficamente y climática del experimento	62
Cuadro 13. Promedios de la producción en masa de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> (1×10^7 conidios/g).....	64
Cuadro 14. Equipos, instrumentos, materiales, medios de cultivo, reactivos, consumibles e insumos.....	67
Cuadro 15. Bioprospección y geo referencia de cepas del género <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> nativas.....	69
Cuadro 16. Características macroscópicas de las colonias aislados de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativas	83
Cuadro 17. Dimensión de los conidios de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	86
Cuadro 18. Promedios de la dimensión de conidios en <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	87
Cuadro 19. Análisis de varianza de la dimensión de conidios entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	88
Cuadro 20. Características microscópicas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativas.....	89

Cuadro 21. Promedio del porcentaje de la pureza de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	91
Cuadro 22. Promedio de la producción <i>in vitro</i> de <i>B. bassiana</i>	93
Cuadro 23. Promedio de la producción <i>in vitro</i> de <i>M. anisopliae</i>	94
Cuadro 24. Análisis de varianza de la producción <i>in vitro</i> entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	95
Cuadro 25. Contraste múltiple de rangos de la producción <i>in vitro</i> entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	95
Cuadro 26. Promedio del crecimiento radial de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> (mm)	96
Cuadro 27. Análisis de varianza del crecimiento radial micelial entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	98
Cuadro 28. Contraste múltiple de rangos del crecimiento radial micelial entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	98
Cuadro 29. Promedios de la producción en masa de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativos en sustratos nutritivos.....	99
Cuadro 30. Análisis de varianza de la producción en masa entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	101
Cuadro 31. Comparación múltiple de rangos de la producción en masa entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> (1×10^8 conidios/g).....	102
Cuadro 32. Porcentaje de la germinación de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	104
Cuadro 33. Análisis de varianza de la germinación entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	105
Cuadro 34. Comparación múltiple de medias de la germinación entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	105
Cuadro 35. Promedio del crecimiento radial micelial de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	106
Cuadro 36. Análisis de varianza del crecimiento radial micelial entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	108
Cuadro 37. Contraste múltiple de rangos del crecimiento radial micelial entre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	108

Cuadro 38. Mortalidad corregida de <i>Hypothenemus hampei</i> por <i>B. bassiana</i>	110
Cuadro 39. Mortalidad corregida de <i>Mahanarva andigena</i> por <i>M. anisopliae</i>	110
Cuadro 40. Análisis de varianza de la mortalidad corregida entre <i>H. hampei</i> por <i>B. bassiana</i> y <i>M. andigena</i> por <i>M. anisopliae</i>	111
Cuadro 41. Contraste múltiple de rangos de la mortalidad corregida entre <i>H. hampei</i> por <i>M. andigena</i>	112
Cuadro 42. Porcentaje de mortalidad de <i>H. hampei</i> por <i>B. bassiana</i> post inoculación (virulencia).....	113
Cuadro 43. Porcentaje de mortalidad de <i>M. andigena</i> por <i>M. anisopliae</i> post inoculación (virulencia).....	114
Cuadro 44. Análisis de varianza de la virulencia de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> entre <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i>	116
Cuadro 45. Porcentaje, percentil 50 (CL ₅₀) y límite de confianza inferior y superior de <i>B. bassiana</i> sobre el <i>Hypothenemus hampei</i> ...	118
Cuadro 46. Porcentaje, percentil 50 (TL ₅₀) y límite de confianza inferior y superior de <i>B. bassiana</i> sobre el <i>Hypothenemus hampei</i> ...	119
Cuadro 47. Porcentaje, percentil 50 (CL ₅₀) y límites de confianza inferior y superior de <i>M. anisopliae</i> sobre el <i>H. andigena</i>	120
Cuadro 48. Porcentaje, percentil (TL ₅₀) y límites de confianza inferior y superior para <i>M. anisoplie</i> sobre el <i>Mahanarva andigena</i> ...	121
Cuadro 49. Concentración letal (50) y tiempo letal (50) de los aislamientos nativos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> sobre <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i> en el laboratorio.....	122

LISTA DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Imágenes del insecto broca del café (<i>H. hampei</i>) observado en el microscopio electrónico de barrido (MEB).....	21
Figura 2. Ciclo de vida de la broca del café (<i>H. hampei</i>).....	22
Figura 3. Ciclo de vida del salivazo (<i>M. andigena</i> Jacobi).....	26
Figura 4. Morfología macroscópica y microscópica del crecimiento experimental de <i>Beauveria bassiana</i>	37
Figura 5. Infection cycle of <i>B. bassiana</i> in insects.....	39
Figura 6. Morfología macroscópica y microscópica del crecimiento experimental de <i>M. anisopliae</i>	42
Figura 7. Colonias aisladas del género <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> nativas en los medios de cultivos SDA y PDA modificada.....	80
Figura 8. Imágenes del cultivo de las colonias aisladas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> nativas, observadas en el haz y envés de las cajas de Petri.....	81
Figura 9. Estructura microscópica de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> ...	85
Figura 10. Conservación de las cepas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	92
Figura 11. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en la mezcla de arroz y maíz.....	93
Figura 12. Mortalidad acumulada de <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i> vs la contracción de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en condiciones de laboratorio.....	115
Figura 13. Porcentaje de mortalidad acumulada de <i>H. hampei</i> y logaritmo de la concentración vs el tiempo (días) de la exposición a <i>B. bassiana</i> a nivel de laboratorio.....	127
Figura 14. Porcentaje de mortalidad acumulada de <i>M. andigena</i> y logaritmo de la concentración vs el tiempo (días) de la exposición a <i>M. anisopliae</i> a nivel de laboratorio.....	128

RESUMEN.

El objetivo de esta investigación fue determinar si el aislamiento de las cepas nativas desde diferentes fuentes y la adición de suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) generan un incremento significativo en la producción y virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena* en el laboratorio, como un aporte a los estudiantes de Ingeniería Agroindustrial y Agronomía de la Universidad Estatal de Bolívar. Para ello, las cepas nativas aisladas de los hongos entomopatógenos en cuestión se sometieron a diferentes tratamientos, resultando el mejor sustrato nutritivo (sustrato más el suplemento nutritivo melaza y leche en polvo, concentración 2,5 g - 0.25 g), en arroz y maíz para *B. bassiana* y *M. anisopliae* el T13, T14, T33 y T34 con $1,89 \times 10^9$ y $1,86 \times 10^9$ conidios/g; $2,50 \times 10^9$ y $2,05 \times 10^9$ conidios/g, respectivamente. Así mismo, se realizó bioensayos para la evaluación de la patogenicidad de tres aislamientos de *B. bassiana* y tres *M. anisopliae* sobre adultos de la broca del café (*H. hampei*) y las ninfas del tercer instar de la caña de azúcar (*M. andigena*); las cepas más patógenas de *B. bassiana* se codificaron con el nombre COMPBb01 y las de *M. anisopliae* COMPMa01, las mismas que eliminaron el 94% y 100% de los insectos plaga, respectivamente. Con estas cepas, se determinó la virulencia a través de la concentración letal 50 (CL₅₀) y el tiempo letal 50 (TL₅₀); la CL₅₀ para eliminar el 50% de la población de *H. hampei* fue 1×10^8 conidios/mL y TL₅₀ 9,4 días; para *M. andigena* la CL₅₀ fue 1×10^7 conidios/mL y TL₅₀ de 6,5 días. Se concluye, que las cepas nativas de la *B. bassiana* y *M. anisopliae*, originarias de la parroquia “Los Ángeles”, cantón Ventanas, provincia de los Ríos-Ecuador, podrían ser las cepas más idóneas para la producción en masa y la elaboración de mico insecticidas a mayor escala, como una alternativa viable al uso de plaguicidas químicos.

Palabras claves: *B. bassiana* y *M. anisopliae*, insectos plaga, sustratos nutritivos, conidios, concentración letal 50 (CL₅₀), tiempo letal 50 (TL₅₀).

ABSTRACT.

The objective of this research was to determine if the isolation of the native strains from different sources and the addition of nutritive supplements to the solid substrates rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) produced a significant increase in the production and virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on *Hypothenemus hampei* and *Mahanarva andigena* in the laboratory, as a contribution to the students of Agroindustrial Engineering and Agronomy of the State University of Bolivar. For this, the native strains isolated from the entomopathogenic fungi in question were subjected to different treatments, resulting in the best nutrient substrate (substrate plus nutritive supplement molasses and powdered milk, concentration 2.5 g - 0.25 g, in rice and maize. For *B. bassiana* and *M. anisopliae* the T13, T14, T33 and T34 with 1.89×10^9 and 1.86×10^9 conidias/g; 2.50×10^9 and 2.05×10^9 conidias/g, respectively. Also, bioassays were carried out to evaluate the pathogenicity of three isolates of *B. bassiana* and three *M. anisopliae* on adults of the coffee borer (*H. hampei*) and the nymphs of the third instar of sugar cane (*M. Andigena*); The most pathogenic strains of *B. bassiana* were coded as COMPBb01 and *M. anisopliae* COMPMa01, which eliminated 94% and 100% of the insect pests, respectively. With these strains, virulence was determined through lethal concentration 50 (LC₅₀) and lethal time 50 (TL₅₀); the LC₅₀ to remove 50% of the *H. hampei* population was 1×10^8 conidias/mL and TL₅₀ 9.4 days; For *M. andigena* the LC₅₀ of 1×10^7 conidias/mL and TL₅₀ of 6.5 days. It is concluded that the native strains *B. bassiana* and *M. anisopliae*, originating in the parish "Los Angeles", Canton Ventanas, province of the Rivers-Ecuador, could be the most suitable for the mass production and processing of insecticides on a larger scale, as a viable alternative to the use of chemical pesticides.

Key words: *B. bassiana* and *M. anisopliae*, insect pests, nutritive substrates, conidia, lethal concentration 50 (LC₅₀), lethal time 50 (TL₅₀).

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática.

El constante y acelerado incremento de la población humana ha generado cada vez más la demanda de alimentos, por tanto el uso irracional de agroquímicos tóxicos para el control de los insectos plaga y de esta manera elevar a corto tiempo el rendimiento de los cultivos, causando efectos secundarios no deseados en la salud humana, la contaminación de los ecosistemas y el aumento de los costes en la producción de alimentos (Parween *et al.*, 2013).

La distribución de los plaguicidas en el ambiente es como sigue: el 3 % se acumula en el suelo; el 1 % perturba al organismo; 44 % se dirige a la atmósfera y sistemas acuáticos y el 25 %, es retenido en el follaje de las plantas afectando a la población que se nutre de dichas plantas, causando enfermedades carcinógenas, teratogénicas y mutagénicas (Crissman, 2012).

En el mundo, cerca de 2 millones de personas se envenenan con plaguicidas cada año, también el agua, suelo y atmósfera se han contaminado; lo que implica a un replanteamiento de tecnologías sustentables para el control de plagas. El manejo habitual de agroquímicos, contribuye a la crisis de la agricultura que altera la preservación de los ecosistemas, los recursos naturales y afecta la salud de las comunidades rurales y de los consumidores

urbanos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura-Organización Mundial de la Salud. (FAO-OMS, 2015).

El uso de hongos entomopatógenos para el control biológico en las últimas décadas ha aumentado la atención mundial (López & Sword, 2015). Existen numerosos reportes sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos (Gurulingappa *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015), dada su capacidad de producir enfermedad y muerte en los insectos, son considerados como un potencial de aislamientos fúngicos dentro del manejo integrado de las plagas (MIP) como agentes de biocontrol (Lopes *et al.*, 2015), por lo que cumplen un importante papel en la regulación de las poblaciones de insectos plaga en los diferentes cultivos (Goettel *et al.*, 2010).

Un hongo es considerado patógeno, cuando tiene la capacidad de colonizar y reproducirse en un hospedero determinado (insecto), originando enfermedad y causando la muerte. Su capacidad patogénica, puede ser evidenciada bajo condiciones naturales o artificiales y diagnosticada con el fin de identificar el agente causal promisorio para el control de una plaga (Vega & Kaya, 2012).

El mantenimiento de la patogenicidad y virulencia es crucial; ya que las cepas de los hongos entomopatógenos, incluyendo la *B. bassiana* y *M. anisopliae*, tienden a la reducción de la esporulación y la virulencia durante los subcultivos sucesivos en los medios artificiales (Shah & Butt, 2005; Lösch *et al.*, 2010).

Los microorganismos en su hábitat natural son capaces de mejorar su papel de recicladores de la materia orgánica e inorgánica, ya que existen diversas especies y diferentes requerimientos metabólicos, razón por la cual es muy importante entender el comportamiento de los microorganismos no solamente en el laboratorio sino en sus ambientes naturales para de este modo manejarlos óptimamente y proporcionarles los nutrimentos necesarios para su crecimiento (Butt *et al.*, 2006).

La falta de los sustratos sólidos adecuados, económicos y fiables es una limitación importante en la producción en masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae*; a la par, la comprensión de las necesidades nutricionales utilizando cualquier técnica de cultivo, es otro factor esencial para su producción. Los cereales, son los sustratos naturales más adecuados, para el crecimiento del micelio superficial y la producción de conidios en hifas aéreas (García *et al.*, 2004; Mongkolwai, 2008).

Las biomoléculas de los sustratos, se componen de macro-micro elementos y éstos están involucrados en los mecanismos de interacción huésped-patógeno y son los responsables del crecimiento del micelio y la producción de conidios (Masoud, 2013).

En la producción en masa de los hongos entomopatógenos, la relación carbono nitrógeno (C: N) es uno de los parámetros más críticos, por la afectación en gran medida a la esporulación, crecimiento de conidios y patogenicidad en el medio o sustrato cuando se cultivan (Mustafa & Kaur, 2009), por lo que es importante velar de esta medida (Kruger *et al.*, 2014).

Un problema importante que no se debe dejar de lado cuando se decide realizar un control biológico de los insectos plaga en los cultivos, es la introducción de cepas exóticas, por el riesgo de atentar contra la bioseguridad de los insectos no objetivos (insectos benéficos) en su hábitat natural (Anderson & Gibson, 1998).

En este contexto, en el Ecuador los cultivos del café (*Coffea arabica* L.) y la caña de azúcar (*Saccharum spp* híbrido), son considerados de interés sustentable. La producción de café está siendo atacada, especialmente por el insecto plaga *Hypothenemus hampei* (Ferrari), afectando la calidad del grano y ocasionando pérdidas económicas (Waterhouse & Norris, 1989; Damon, 2000). Del mismo modo, el ataque agresivo de *Mahanarva andigena* (Jacobi), está originado problemas en el cultivo de la caña de azúcar; generando pérdidas de hasta 15 % de sacarosa. Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador (CINCAE, 2013).

Frente a esta dificultad, en el actual estudio se han considerado a los insectos plaga *H. hampei*, *M. andigena*, como los principales problemas agrícolas, por lo que se llevó a cabo un bioensayo para la determinación de la patogenicidad y la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas a nivel de laboratorio, como un aporte al control microbiológico.

De allí la importancia de aportar a un desarrollo solidario, ecológico y compatible con la conservación del ambiente, desde las comunidades educativas a través de la implantación de tecnologías limpias para el control de las plagas agrícolas, utilizando como biocontroladores, los hongos entomopatógenos opción que permite la reducción del uso de los plaguicidas químicos, los cuales han tenido impactos negativos en los diferentes agro ecosistemas, debido a la contaminación y el poder residual en los organismos vivos por el uso que estos agro tóxicos representan (Inglis *et al.*, 2001).

Por otro lado, un problema relevante que existe en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente (FCARNA) de la Universidad Estatal de Bolívar (UEB), es la falta de una colección de hongos entomopatógenos, por lo que es necesario el establecimiento de un Banco de cepas fúngicas nativas, con la finalidad de que los estudiantes realicen sus prácticas y transfieran la tecnología hacia el sector agrícola a través de la vinculación con la colectividad.

Muchos otros problemas podrían añadirse y es necesario abordarlos en su estudio mediante un análisis multidisciplinario, ya que dado su carácter dual, natural y social, deben participar los estudiantes, los profesionales de todas las áreas del conocimiento y las personas preocupadas por la protección del ambiente. En definitiva, se requiere de una evaluación de los problemas ambientales con una orientación integrada que abarquen todos los medios, presiones y actividades humanas (Bolaños, 1990).

Con estos antecedentes, en la presente investigación se tributó de alguna manera a la solución del problema, mediante las acciones realizadas en el planteamiento de los objetivos propuestos.

1.2. Formulación del problema.

1.2.1. *Problema general.*

¿El aislamiento de cepas nativas y la adición de suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.) no generan incremento significativo en la producción y virulencia *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena* a nivel de laboratorio?

1.2.2. *Problemas específicos.*

¿El aislamiento de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a partir diferentes fuentes y la determinación de sus características morfo fisiológicas y biológicas confirma su género y especie?

¿La adición de algunos suplementos nutritivos: melaza, harina de amaranto y soya; leche en polvo y levadura al arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.) generan un incremento significativo en la producción y virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*. Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi) en el laboratorio?

¿La aplicación de un bioensayo utilizando los aislamientos nativos *Beauveria Bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi), permite la valoración de la patogenicidad y virulencia en el laboratorio?

1.3. Justificación teórica.

La Constitución Política del Ecuador (2008), en el Capítulo Segundo. Artículo. 15 declara que: El Estado promoverá, en el sector público y privado el uso de tecnologías ambientalmente limpias.

En uno de los postulados del buen vivir, dice: es responsabilidad de la sociedad ecuatoriana poner en práctica sus principios para lograr una relación armónica sustentable, entre el ambiente y la salud, que inserte tecnologías de producción de bioformulados microbianos que presenten características deseadas como agentes de biocontrol de las plagas (Crissman, 2012).

La aplicación de una agricultura convencional dominante con paquetes tecnológicos establecidos y sistemas crediticios importados de otros países financieramente ricos, tecnológicamente desarrollados pero pobres en biodiversidad, ocasionaron efectos catastróficos, por lo que se determina que estas prácticas son obsoletas y han sido uno de los factores de mayor destrucción de los ecosistemas, arruinaron a miles de campesinos, aumentaron la concentración de la tierra en manos de pocos, destruyeron y desagregaron el núcleo familiar (Restrepo, 2007).

Sin embargo, el empleo de los insecticidas químicos ha acarreado una serie de efectos adversos sobre los seres vivos y el medio ambiente tales como toxicidad aguda y crónica en los humanos, los animales domésticos y de vida salvaje, la fitotoxicidad, el desarrollo de las plagas por especies que antes no constituían amenaza, la persistencia de estos productos en el suelo y agua, así como su capacidad de transporte, la contaminación ambiental, la aparición de resistencia a los insecticidas y su acción negativa sobre la artropofauna útil (Gerwick & Sparks, 2014).

La FAO (2012), hace alusión a las pérdidas en la producción agrícola mundial por las plagas y enfermedades de cerca del 20 y 40%, de éstas el 10% de las cosechas se destruyen por los roedores e insectos, originando reducciones

económicas de miles de millones de dólares al año e informa la necesidad mundial de producir el 60 % más de los alimentos para el sustento de una población que está en crecimiento constante en todo el planeta hasta el 2050; la agricultura deberá seguir suministrando un 80% de los alimentos del mundo; por lo tanto, reducir las pérdidas causadas por las plagas en los cultivos es de gran importancia.

Este escenario agudiza la necesidad de aunar esfuerzos y proponer soluciones viables al sector agrícola para satisfacer las necesidades. mediante la búsqueda de nuevas estrategias de control de las plagas que se ajusten a los principios de la Agricultura Sostenible, entre las que han adquirido especial relevancia los bioinsecticidas a base de agentes entomófagos y entomopatógenos, semioquímicos, e insecticidas derivados de las plantas y de microorganismos (Czaja *et al.*, 2015).

A este respecto, los hongos entomopatógenos han recibido una atención creciente en los últimos años por sus interesantes características para el desarrollo de bioinsecticidas y de nuevas estrategias en la protección de los cultivos.

1.4. Justificación práctica.

Los hongos entomopatógenos son muy importantes y se encuentran distribuido en la mayoría de los ecosistemas terrestres, con más de 750 especies descritas procedentes de los diversos hábitats como el suelo, insectos, frutos y otros (Scheepmaker & Butt, 2010; Quesada-Moraga *et al.*, 2014a), que se caracterizan por ser patógenos de artrópodos y controladores directos de otras poblaciones microbianas, que se utilizan en los programas de control de las plagas.

Los Ascomicetos, más ampliamente distribuidos son los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, ambos con origen monofilético dentro de las familias

Cordycipitaceae y Clavicipitaceae, respectivamente (Bischoff *et al.*, 2009; Rehner *et al.*, 2011) presentan buena eficacia insecticida, son de fácil manejo para la producción en masa, factibles de comercialización como mico insecticidas, las mismas que deben cumplir con los parámetros de calidad para que sean efectivas (Pell *et al.*, 2010).

En los hongos entomopatógenos la unidad infectiva contra los insectos plaga son los conidios, estructura que se requiere para la producción masiva de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, principalmente; por lo que, es indispensable la creación de una mico teca en la FCARNA de la Universidad Estatal de Bolívar.

En esta investigación, se contó con las cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, purificadas e identificadas mediante la determinación de las características morfo-fisiológica y biológicas que confirmaron el género y especie. Además, la selección y la conservación de las cepas más promisorias para la producción en masa de los hongos entomopatógenos que cuenten con una acción patogénica y virulenta sobre insectos plaga a nivel de laboratorio y a futuro se experimente en el campo.

Esta investigación en la práctica, es una novedad científica, de interés y factible de realizar en la Universidad Estatal de Bolívar como un aporte al área de Microbiología y Biotecnología, por cuanto se contaría con biomasa de cepas nativas de los hongos entomopatógenos, constituyéndose en una reserva genética fúngica para dar inicio al establecimiento del Banco Genético Microbiano (mico teca).

Además, esta acción, permitirá a los estudiantes de Ingeniería Agroindustrial contar con las cantidades suficientes de conidios para la agregación de valor, elaborando bioinsecticidas; los mismos, que utilizarán los estudiantes de Ingeniería Agronómica para el biocontrol de los insectos plagas agrícolas.

Para la comprobación y la veracidad de las hipótesis, se formularon los siguientes objetivos:

1.5 Objetivos.

1.5.1. *Objetivo general.*

Determinar si el aislamiento de cepas nativas de diferentes fuentes y adicionar suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) permite generar el incremento significativo de la producción y virulencia en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena* en el laboratorio.

1.5.2. *Objetivos específicos.*

Determinar si el aislamiento de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a partir diferentes fuentes y valorar las características morfo fisiológicas y biológicas permite la confirmación de su género y especie.

Determinar si la valoración de los parámetros de producción masiva de conidios con la adición de suplementos nutritivos al arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) permite generar el incremento significativo en la producción de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el laboratorio.

Determinar si la aplicación de un bioensayo utilizando los aislamientos nativos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*. Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi), permite la valoración de la patogenicidad y virulencia en el laboratorio.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación.

2.1.1. *Fundamentación filosófica.*

La presente investigación se basó en el paradigma positivista de acuerdo a Hernández *et al.*, 2008, ellos consideran al laboratorio como el contexto para la investigación, mediante un diseño pre estructura y esquematizado de las metodologías, las técnicas e instrumentos; su lógica de análisis está enfocada a la observación, la confirmación reducción, la verificación descriptiva, la inferencia e hipotética deductiva del análisis y los resultados obtenidos en el laboratorio y campo.

Los fundamentos teóricos y metodológicos se sustentaron en la concepción filosófica dialéctica-materialista, se justifica por las necesidades sociales relevantes, actuales y las perspectivas de una formación ambiental que le proporciona al hombre el marco teórico integrador para la orientación en el complejo sistema de las interacciones cognitivas, económicas, políticas e ideológicas. El basamento filosófico de la actividad como condición inherente al ser humano, quien consciente actúa sobre él mismo y el entorno, la unidad dialéctica de la relación sujeto-objeto que hace posible la interacción reciproca de lo ideal y lo material en la actividad humana, el objeto como condicionante material y el sujeto como ser activo, consciente y transformador (Pérez, 2014).

La epistemología ambiental, orienta hacia la concienciación y aprendizaje de una nueva fundamentación. La filosofía reflexiona sobre el conocimiento, los valores y fines para la conservación del ambiente, estableciendo prioridades, en las dimensiones del par dialéctico del aprender a saber hacer y ser para convivir en armonía con el ambiente. Los Recursos Ambientales son elementos esenciales para la existencia de la vida y por ello la Variable Ambiental debe insertarse como el eje transversal para el desarrollo socio-económico-cultural de las poblaciones humanas. La mayor parte de los recursos naturales, pueden ser renovables y están condicionados por el manejo adecuado de los factores que impactan el ambiente, permitiendo su estabilidad y la permanente disposición de dichos recursos de modo sustentable (Chávez, 2016).

Además, esta investigación se fundamentó en la filosofía del conocimiento de la minimización de los residuos, cuya característica es dar valor agregado a toda aquella cantidad de material que no tiene valor económico y hay que confinarlo mediante las acciones siguientes: aplicación de un sistema de la gestión de los residuos, la mejora de procesos, la creación de tecnologías versátiles o eliminación de tecnologías muy onerosas, la capacitación constante del sector involucrado, una legislación acorde al contexto e interculturalización de respecto al ambiente para poder alcanzar un desarrollo sostenible que beneficie a la humanidad (Chávez, 2016).

En este caso, se minimizaron los residuos restantes de la producción de cereales, al suministrar valor agregado a los sustratos sólidos arroz y maíz partidos en vez del uso de los granos enteros. Por otro lado, se contribuyó de alguna manera hacia una orientación filosófica a la solución de uno de los tantos problemas ambientales anotados anteriormente, caso concreto: generación de principios bioactivos (conidios) para la elaboración de los bioinsecticidas como una alternativa tecnológica viable al uso indiscriminado de plaguicidas químicos para el control de los insectos plagas agrícolas.

2.1.2. Fundamentación Legal.

En el capítulo segundo de los derechos del buen vivir, sección segunda ambiente sano, artículo 14 manifiesta lo siguiente: “Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, “sumak kawsay” (Constitución República del Ecuador, 2008).

“Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados”.

En el Capítulo tercero de la constitución dentro del Régimen de Desarrollo, de la Soberanía Alimentaria, artículo 281 manifiesta: “La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiados de forma permanente”.

En el ítem 7 Declara: “Fortalecer la diversificación y la introducción de tecnologías ecológicas y orgánicas en la producción agropecuaria”. Ítem 8. Asegurar el desarrollo de la investigación científica y la innovación tecnológica apropiada para garantizar la soberanía alimentaria. Ítem 9. Regular bajo normas de bioseguridad el uso y desarrollo de la biotecnología, así como su experimentación, utilización y comercialización.

2.2. Antecedentes de investigación.

Como antecedentes de las investigaciones realizadas por otros autores, se han recabado información muy valiosa, que están en correspondencia con el

tema de la presente investigación, a continuación, se detallan la información más relevante.

En la publicación ejecutada por Clemencia Guedez en la University of the Andes (Venezuela), en el tema: **Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo Venezuela.**

Aisló y caracterizó morfológica diez aislados de *Beauveria spp.* Además, realizó cultivos monospóricos de diez aislamientos para su crecimiento inoculando en el medio papa-dextrosa-agar, midió el tamaño de las esporas. Para la caracterización cultural, realizó vigilancias a los 13 días después de sembrados y describió las características: el color, el borde, el aspecto de la colonia y la pigmentación del medio. Concluyó: el crecimiento de los aislados de hongos entomopatógenos en cámaras húmedas permite la caracterización morfológica; éstos evaluados en los diez aislamientos, mostraron que pertenecen a la especie *B. bassiana* y que todos los aislamientos caracterizados como *B. bassiana* presentaron colonias algodonosas de color blanco que luego se tornaron pulverulentas (Guedez, 2014).

Ibrahim *et al.*, en el Departamento de Protección de Cultivos, Facultad de Ingeniería Agrícola y Medicina Veterinaria, Universidad Libanesa, Líbano, con la investigación: **Producción en masa, rendimiento, calidad, formulación y eficacia de conidios entomopatógenicos de *Metarhizium anisopliae*.**

Cultivaron un aislado local *M. anisopliae* en arroz cocido, trigo, cáscaras de vegetales y burgul en bolsas de torrefacción para producir y cosechar polvos de esporas. Determinaron el rendimiento total de conidios, el control de calidad para evaluar la concentración, germinación, pureza, contenido de humedad y la patogenicidad contra el áfido de la rosa, *Macrosiphum rosae* L., del ciruelo, *Hyalopectus pruni* y del melón, *Aphis gossypii* Glover. Los conidios se almacenaron a diferentes temperaturas durante 16 semanas. Los bioformulados con aceite se probaron contra la mosca blanca bajo condiciones de campo. Resultados: el sustrato burgul presentó el mayor

rendimiento (21 g/100 g). El tiempo óptimo para la cosecha fue de 3 semanas. La relación carbono-nitrógeno (C: N) fue también la más baja para los conidios producidos en burgul causando las mortalidades más altas y así aparecieron los más virulentos contra todos los insectos probados. Las conidias formuladas con aceite de girasol retuvieron la viabilidad durante al menos 16 semanas a temperatura ambiente. Conclusión: *M. anisopliae* podría ser producida en masa en grandes cantidades sobre el sustrato burgul. La calidad de los inóculos producidos, medida por las relaciones C: N endógenas, se vería afectada en gran medida por el sustrato utilizado para la producción en masa. La calidad también influiría en la eficacia contra los insectos diana. Se recomienda el uso de la relación C: N endógena como indicador de control de alta calidad para inóculos. El uso de cáscaras vegetales como sustrato potencial para la producción en masa combinado con un aceite reciclable como formulante podría ser una tecnología económica y ambientalmente sostenible para la futura producción en masa de hongos entomógenos (Ibrahim *et al.*, 2015).

En la investigación desarrollada por Juan Manuel Ballesteros Torres, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Subdirección de Estudios de Posgrado, en el tema: **Factores Nutricionales que Afectan la Actividad Insecticida de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin contra *Periplaneta americana* L. y la Respuesta Inmune del Insecto.**

El autor, hace referencia en su parte introductoria a la relación existente entre las fuentes de C: N y el éxito en el control biológico de las plagas.

La cantidad óptima de fuentes de C y N, se ha observado que además de definir las estructuras producidas en el hongo entomopatógeno, influyen en la producción de enzimas participantes en el proceso infectivo (proteasas, lipasas, quitinasas), las cuales son de gran importancia para la efectividad y éxito del control biológico (Ali *et al.*, 2010).

Los principales componentes de la cutícula del insecto son: quitina, proteínas y lípidos. Bajo este contexto, las quitinasas (NAGasa), enzimas ligadas a quimioelastasas (Pr1) y tripsina (Pr2) se consideran las enzimas determinantes de virulencia en los hongos entomopatógenos, como la *B. bassiana* y *Metarhizum anisoplie* (Metschnikoff). Las enzimas están implicadas en la germinación y la formación del apresorio en los conidios. Se ha demostrado que añadiendo fuentes de carbono y nitrógeno al Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) se observa una mayor producción de Pr1 y Pr2 que la producción de NAGasa o esterases (Qazi y Khachatourians, 2008; Castrejón-Antonio *et al.*, 2012).

Por otro lado, se ha observado que algunas diferencias en la actividad insecticida de microorganismos entomopatógenos puede estar relacionada con la respuesta inmune innata del insecto, en donde, el sistema de fenol oxidasa (PO) juega un papel muy importante en la defensa y resistencia del entomopatógeno (Valadez-Lira *et al.*, 2011). En este contexto, en un trabajo preliminar se evaluaron diferentes aislamientos de *B. bassiana* contra las fases del ciclo de vida de *P. americana* y encontraron diferencias significativas en la respuesta inmune humoral mediada por la actividad PO (Damas, 2012), pero no se tienen datos de como pudieran influir la actividad enzimática del hongo en la respuesta inmune del insecto.

En el estudio realizado en los laboratorios de PROCAFE (Fundación Salvadoreña), en el **Aislamiento y patogenicidad del hongo nativo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Controlador biológico de la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari).**

Se obtuvieron aislados del hongo nativo *B. bassiana* desde las brocas del café a partir del cual obtuvieron esporas en medio sólido arroz pre cocido. Determinaron la patogenicidad del hongo sobre *H. hampei* usando un bioensayo en laboratorio y campo. La variable evaluada fue el número de brocas muertas a 17 días de la aspersión. Los resultados de la patogenicidad, indican que las diferentes dosis y concentraciones del hongo producido en el arroz causaron mortalidad sobre las brocas, no existiendo entre ellas

diferencias significativas; recomendando, que se puede utilizar como biocontrolador de la broca en el campo en cualquier dosis (Arias, 2007).

En la investigación local efectuada en el Laboratorio de Producción de Entomopatógenos, Agro Calidad, Puyo, Ecuador en el **Control biológico del salivazo (*Mahanarva andigena*) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con *Metarhizium* sp. (Fungi: Ascomycota: Clavicipitaceae).**

Aislaron, las cepas nativas del entomopatógeno *Metarhizium* sp., procedentes de tres sectores cañeros del cantón Pastaza y fueron cultivados en Papa Dextrosa Agar y Sabouraud Dextrosa Agar. Concluyen que el aislamiento de la Cepa 1 (originaria de las Américas, Puyo, Pastaza) de *Metarhizium* sp., a la concentración $1,1 \times 10^8$ conidios/mL, fue la más virulenta contra las ninfas y los adultos de *Mahanarva andigena*, con la mayor tasa de mortalidad (90,95%) a los 14 días del experimento. *Metarhizium* sp., es un agente de control biológico que ha demostrado su efectividad en el campo y debería ser parte de los programas del manejo integrado del *M. andigena* en parcelas agrícolas de la caña de azúcar para su biocontrol (De la Cruz & Cajilima, 2016).

En la investigación realizada por Ana Laura Nussenbaum, en el Laboratorio sobre los Hongos Entomopatógenos, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires Aislamientos, con el tema: ***Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae).**

Aisló hongos entomopatógenos nativos desde muestras de suelos e insectos, y usó las cepas del mico teco del Laboratorio. Evaluó la patogenicidad y la virulencia de 28 aislamientos de *M. anisopliae* y 66 aislamientos de *B. bassiana* sobre adultos de picudo y, estudió los efectos subletales sobre la alimentación y la oviposición producidos por estos hongos en el laboratorio. Concluye: los aislamientos de *M. anisopliae*, Ma 20 y Ma 50, son candidatos para ser utilizados en el control de *A. grandis*; considera que es necesario continuar trabajando en la producción y formulación de estos aislamientos

para poder evaluar la eficiencia de estas cepas nativas en el campo (Nussenbaum, 2014).

Para la producción en masa de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en los sustratos sólidos nutritivos, de la presente investigación, se utilizó el Manual of Techniques In Invertebrate Pathology. Chapter VIII. Mass production of Entomopathogenic Hypocreales de Stefan Jaronsky y Mark Jacson (2012) and Mass production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. Chapter XI de Stefan Jaronsky (2014).

2.3. Bases teóricas.

2.3.1. La agricultura y los insectos plaga

Las plantas a través del proceso fotosintético construyen sus propios tejidos, los mismos que son utilizados por los distintos organismos que se encuentran ubicados en los distintos niveles tróficos. Los humanos no podrían existir sin los productos que les ofrecen las plantas, una dependencia que sin duda catalizó la aparición de la agricultura, revolución que dio origen a las primeras civilizaciones, pero también a las primeras alteraciones ecológicas, donde se rompe el equilibrio entre los distintos eslabones de la cadena trófica, en especial entre la planta y el fitófago, y entre éste y sus enemigos naturales, siempre a favor del herbívoro (Resquín, 2016).

Por lo tanto, es esencial proteger a las plantas, especialmente frente al ataque de los insectos plaga, el grupo animal de mayores proporciones, cerca de un millón de especies de las que alrededor del 50% se alimentan de plantas o de productos de plantas (Tremblay, 1993; Speight *et al.*, 2008).

Los insectos plaga han sido combatidas por el hombre desde el surgimiento de la agricultura, con métodos culturales y sustancias de origen vegetal y químicos; en el siglo XIX se empezaron a utilizarse los insecticidas

inorgánicos y después de la segunda guerra mundial los insecticidas químicos de síntesis; y en el último tercio del siglo XX, se incorporan una sucesión de nuevas materias activas insecticidas (formamidinas, fenilpirazoles, neonicotinoides, otras), que en su conjunto han permitido preservar más del 70% de la producción agrícola potencial mundial (Jones, 1973; Casida & Quistad, 1998; Ware & Whitacre, 2004; Oerke, 2006).

Sin embargo, el empleo de insecticidas químicos ha acarreado una serie de efectos adversos sobre el ambiente, los seres vivos, la toxicidad aguda y la crónica en los humanos, los animales domésticos y los de vida salvaje, la fitotoxicidad, el desarrollo de las plagas por especies que antes no constituían amenazas, la permanencia de estos tóxicos en el suelo y el agua, así como la resistencia a los insecticidas de síntesis y su acción negativa sobre la artropofauna benéfica (Gerwick & Sparks, 2014).

Este contexto, se agudiza la necesidad de la exploración de nuevas estrategias de control de las plagas que se ajusten a los principios de la agricultura sostenible (Resquín-Romero, 2015) destacándose los bioinsecticidas a base de agentes entomófagos y entomopatógenos, semioquímicos, e insecticidas derivados de plantas y de microorganismos (Czaja *et al.*, 2015). No obstante, este tipo de bioinsumos a nivel mundial ingresa en el mercado con lentitud, los productos microbianos sólo representan el 3% de todos los productos fitosanitarios comercializados (Ravensberg, 2015), ya que aún deben mejorarse tanto su eficiencia como su competencia ambiental (Lacey *et al.*, 2015).

2.3.2. Plaga agrícola.

Es cualquier especie, raza, biotipo vegetal o animal patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (Citado por FAO, 2009a). Plaga agrícola es también una población de animales fitófagos que disminuye la producción del cultivo, reduce el valor de la cosecha o incrementa sus costos de producción. Es un criterio esencialmente económico (Daxl *et al.*, 1994).

Los insectos plaga producen graves daños en la agricultura (Kol *et al.*, 2014). La utilización de los hongos entomopatógenos en la agricultura ha ido en aumento en los últimos años debido al gran potencial que tienen en el manejo de plagas, representando una alternativa eficiente al uso de insecticidas químicos, considerados altamente nocivos para la salud del hombre y los ecosistemas (Téllez *et al.*, 2009).

En la actualidad, se conocen más de 1500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus que son patógenos de artrópodos y controladores de otras poblaciones microbianas. Sin embargo, solo unos pocos se usan rutinariamente en los programas de control de las plagas (Elósegui, 2006).

Los hongos entomopatógenos constituyen uno de los grupos de gran importancia en el control biológico de insectos plaga y vectores de enfermedades. Los insectos son susceptibles a ciertas enfermedades causadas por estos hongos (García *et al.*, 2011).

A continuación se describen los dos insectos plaga que atacan mayormente a los cultivos del café y la caña de azúcar en las zonas tropicales de Ecuador, que se utilizaron en los bioensayos de la presente investigación para la comprobación de la patogenicidad y la virulencia de los aislados nativos cultivos en los sustratos nutritivos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la *Hypothenemus hampei* Ferrero y *Mahanarva andigena* Jacobi, respectivamente a nivel de laboratorio.

2.3.2.1. La broca del fruto de café *Hypothenemus hampei* Ferrari 1867.

El insecto, procede de Uganda y llegó a Brasil en 1913 donde se adaptó al ecosistema y aumentó su población por las condiciones favorables para su desarrollo y la carencia de enemigos naturales; es la plaga del cultivo del café que mayor pérdida en la producción ocasiona (Bustillo, 2006).

La broca es la plaga más devastadora del cultivo de café, convirtiéndose en el principal problema entomológico que afecta la caficultura en muchos países del mundo. Se alimenta y reproduce en el endospermo del fruto reduciendo

su valor comercial y en muchos casos ocasiona la caída prematura de los mismos; es una especie de hábitos monófagos, exclusiva del género *Coffea* (Bustillo, 2008a; Benavides *et al.*, 2012).

El cultivo de café se halla dentro de las principales actividades agrícolas que se realiza en el Ecuador, debido a su importancia económica y social en la generación de divisas y empleo. Se localizan entre los diez cultivos con mayor superficie; además, es sembrado en 21 provincias del país (Monteros, 2016).

Por otra parte, la *H. hampei* ha sido asociado al hongo entomopatógeno *B. bassiana* y fue reportado atacando a la broca en el Ecuador en el año de 1990. En la actualidad, es considerada como la mayor biocontroladora natural de la plaga del café y está causando mortalidad del insecto en todos los países donde ésta ha llegado, convirtiéndose en parte de la estrategia del manejo integrado de este insecto plaga (CENICAFÉ, 2010).

2.3.2.1.1. Taxonomía de la broca del fruto de café *H. hampei*. La taxonomía del insecto plaga (ver Cuadro 1).

Cuadro 1. Taxonomía de la *H. hampei*.

Reino:	Animalia
Phylum:	Artrópoda
Clase:	Insecta
Orden:	Coleóptera
Familia:	Scolytidae
Género:	<i>Hypothenemus</i>
Especie:	<i>Hypothenemus hampei</i>

Fuente. Constantino *et al*, 2011.

2.3.2.1.2. Descripción macro morfológica de la *H. hampei*. Los nombres comunes de la broca del fruto de café son: el gorgojo barrenador del grano del cafeto, el gorgojo del café y el taladro de cereza del cafeto. El color, va de color negro a marrón oscuro brillante y su cuerpo está cubierto de pelos muy finos (setas). El tamaño del insecto fluctúa de 1,5 a 2 mm de largo. La

producción de los huevos es de 60 a 75 unidades (100 % fértiles). Se reproducción: Especies del género *Coffea*, frijol, gandul, guaba, poró y maíz.

2.3.2.1.3. Descripción micro morfológica de *H. hampei* vista desde el microscopio electrónico de barrido (MEB). El insecto coleóptero es muy pequeño, su tamaño es similar a la cabeza de un alfiler, su descripción micro morfológica (ver Figura 1).

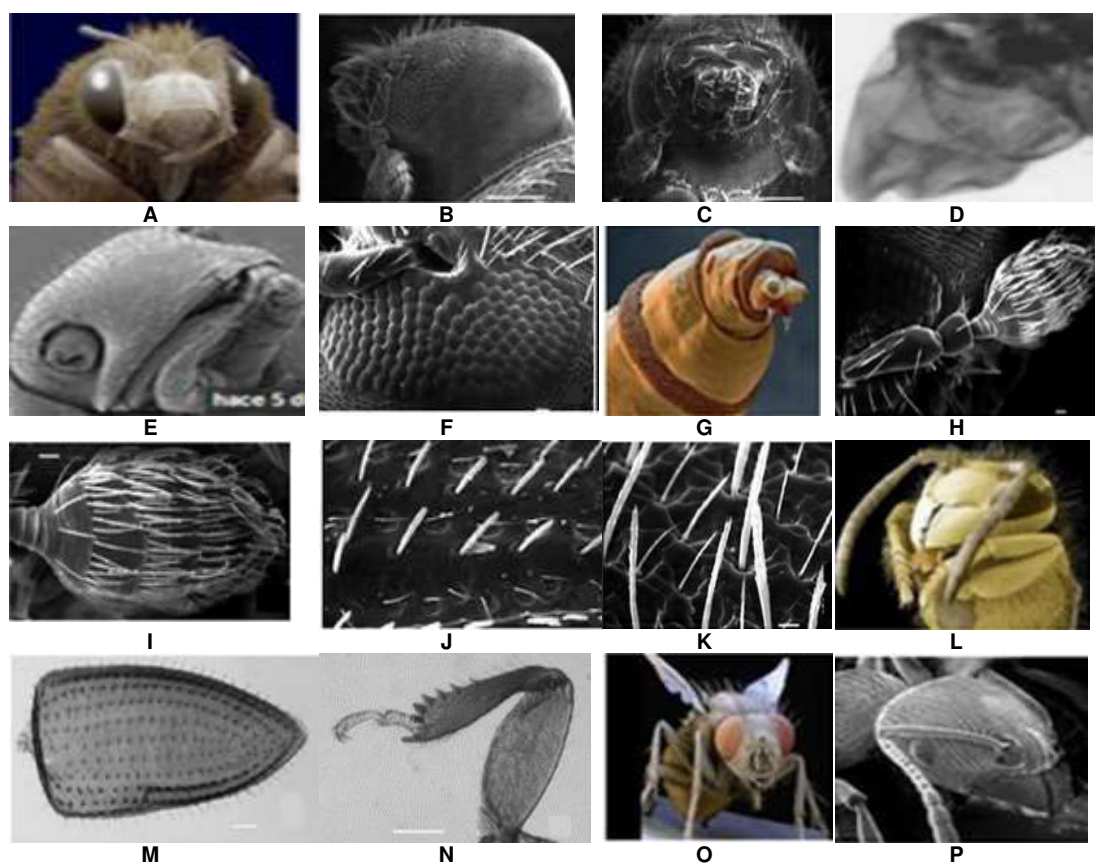
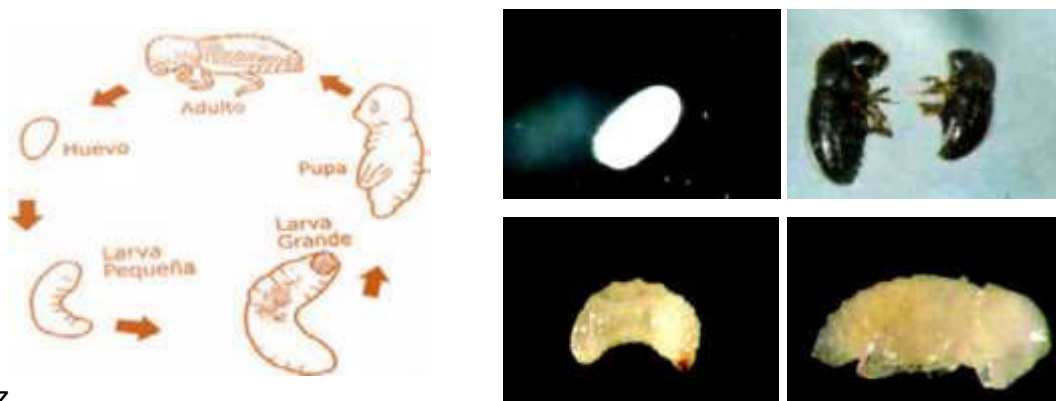


Figura 1. Imágenes del insecto broca del café (*H. hampei*) observado en el microscopio electrónico de barrido. (A). Vista frontal. (B). Cabeza, vista lateral, escala = 100 µm. 230X. (C). Aparato bucal, escala = 100 µm. 230X. (D). Mandíbula izquierda de una hembra adulta. (E y F). Ojo compuesto de la hembra, presentan en promedio un número aproximado de 115 omatidios (G). *H. hampei*, vista lateral. (H). Antena de las hembras, escala = 10 µm a 400X (I). Porra de la antena, escala = 10 µm a 800X. (J) Setas de los élitros, escala = 10 µm a 500X (K) Setas en el pronoto, escala = 10 µm a 950X. (L). Vista de perfil. (M). Élitro derecho de una hembra con 11 interestrías y 10 estrías dispuestas longitudinalmente. (N). Pata protorácica con 7 espinas tibiales, escala = 0,1 mm, 40X, 80X. (O). Adulto desplegando sus alas y (P) Vista ventral del adulto. *Fuente:* Constantino *et al.*, 2011. El Huffington Post, 2013.

2.3.2.1.4. El ciclo de vida de la *H. hampei*.

El insecto plaga, tiene una metamorfosis completa, se hospeda en los frutos de café la mayor parte de su vida. La hembra fecundada pone sus huevos construyendo galerías en el fruto del café o pergamino, cuando la larva eclosiona penetra al grano de café donde se alimenta y se reproduce; en el cual se transforma en abejones adultos. El ciclo del insecto dura entre 45-60 días, favorecida por lluvias o altas humedades relativas y temperaturas entre 19-22 °C (Bustillo, 2008^a).

Consta de cuatro estados: huevo, luego pasa a larva (pequeña y grande) después a pupa y por último al estado adulto. El promedio de duración de los estadíos del insecto es el siguiente: huevo 7 días, larva 11 días, pupa 5 días y adulto 64 días (Ver Figura 2).



Z

Figura 2. Ciclo de vida de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867).
Fuente: Centro Nacional de Investigaciones de Café, Colombia (CENICAFÉ) y Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFÉ). s/f.

La destrucción del grano de café lo inician las hembras de la broca al taladrar los frutos en la región del disco (ombbligo) de la corona del fruto. Solamente, la hembra adulta vuela y pasa de una planta a otra, perforando y penetrando los frutos verde o maduros del café; llegando de esta manera al endospermo y formando cámaras donde se alimentan tanto las larvas como los adultos, se reproducen depositando sus huevos de los cuales emergen las larvas que

destruyen gran parte de la semilla, causando pérdidas en su peso y la calidad del grano (Bustillo, 2008^a).

La broca ataca al café entre los 70-170 días después de la floración, atraída por los metabolitos secundarios que producen aromas azucarados. Las hembras del remanente de la floración anterior llegan al endospermo donde depositan dos o tres huevos al día por 20 días hasta su muerte (Camilo *et al.*, 2003). Las larvas se nutren del interior dejándolo vacío y degradado, muy susceptible a procesos de fermentación aerobia de microorganismos que entran a través de la galería (Bustillo, 2008^b).

2.3.2.2. El salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi). La caña de azúcar (*Saccharum spp.*, híbrido), es una poácea nativa de las regiones tropicales y subtropicales en varios países de América, el Caribe y Ecuador: Se han registrado 33 especies de insectos plaga, la mayoría de las cuales carecen de importancia económica o pasan inadvertidas por cuanto sus poblaciones se mantienen constantes y causan poco daño al cultivo (CINCAE, 2008b), excepto el salivazo que es una de las plagas más importantes de la caña de azúcar (Mendoza, 2004).

Este cultivo constituye uno de los rubros agrícolas más importantes en el Ecuador y representa un lugar significativo en la actividad económica y social del país por su contribución al producto interno bruto agrícola nacional del 12% (Lasso *et al.*, 2010). El cultivo de caña de azúcar es un agro ecosistema que hospeda una diversidad de especies de insectos y algunos de estos, en dependencia de la zona y la época del año, pueden ocasionar daños de importancia económica (Portela *et al.*, 2010, citado por Valle, 2015).

Al igual que otros cultivos es afectada por varias especies de insectos plaga (Torres *et al.*, 2013). En el mundo existen más de 1500 especies que han sido informadas alimentándose de las plantas de caña de azúcar (Portela, 2008). Existen varias especies que difieren en sus hábitos alimenticios, las ninfas son de hábitos radicales y en otras se localizan en el follaje. Todas tienen en

común el hábito de producir una masa espumosa en forma de saliva, lo que le confiere el nombre de “salivazo” (Mendoza, Mejía, & Gualle, 2004).

En el Ecuador entre otras plagas, se destaca el salivazo (*M. andigena*), que se encuentra localizada en diferentes zonas del país (Gómez *et al.*, 2014). Generalmente, el perjuicio ocasionado por el salivazo, reduce el rendimiento de las plantaciones, incrementa los costos de producción y afecta la calidad del producto. El salivazo, arremete en la fase adulta del insecto que para alimentarse perfora y succiona las partes verdes del “cogollo”, efecto que seca las hojas y reduce el crecimiento de la planta (Bustillo, 2011).

Investigaciones recientes, consideran que el control biológico del salivazo con el hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, puede ser una alternativa al uso de insecticidas químicos; además, provee otro beneficio agregado como biocontrolador del barrenador *Diatraea saccharalis* Fabricius y no afecta a los enemigos naturales del salivazo, como la avispa *Salpingogaster nigra* (Schiner). (Tiago *et al.*, 2011).

2.3.2.2.1. Taxonomía de la *M. andigena*. La taxonomía del insecto salivazo de la caña de azúcar (ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Taxonomía de la *M. andigena* Jacobi.

Reino:	Animalia
Phylum:	Artrópoda
Clase:	Insecta
Orden:	Hemíptera
Suborden:	Auchenorrhyncha
Super familia:	Cercopoidea
Familia:	Cercopidae
Sub familia:	Tomaspidinae
Tribu:	Tomaspidini
Género:	<i>Mahanarva</i>
Especie:	<i>Mahanarva andigena</i>

Fuente. Mendoza, 2012.

2.3.2.2.2. Descripción morfológica de *M. andigena*: los huevos son muy pequeños, difíciles de observar a simple vista, tienen forma de granos de arroz muy diminutos de longitud media de 1.3 mm y 0.39 mm de diámetro. La superficie es lisa, de color blanco luego amarillo cremoso y cerca de la eclosión es rojizo, con la presencia de las manchas oculares y abdominales laterales (Castillo, 2006; Mendonça, 2009).

Los huevos muestran una viabilidad elevada, en torno al 81% y en condiciones ideales, con humedad relativa (HR) de 80- 90%, eclosionan entre 12 a 18 días, período que puede prolongarse por varios meses durante la época seca (HR menor a 45%) pero en condiciones desfavorables se inhibe la incubación y los huevos entran en hibernación, que pueden durar varios meses, hasta que las ambientes sean favorables (García *et al.*, 2007a).

Las ninfas, se originan de la eclosión del huevo, que pasa por cinco instares absolutamente distinguibles (Ver Figura 3), generando una muda en cada una de ellas y aumento de tamaño, desarrollando gradualmente las estructuras alares y reproductivas; el ancho de la cápsula cefálica es la característica morfológica más distintiva para separar los instares. Las ninfas recién emergidas (primer instar) tienen una longitud media de 1 mm y son de matiz crema, con un punto naranja-rojizo, situado entre el 5° y 8° segmento abdominal a cada lado del abdomen y ojos rudimentarios de color rojo (Rodríguez *et al.*, 2002; Cetino, 2008 y Castillo, 2006).

Los adultos, tienen hábitos aéreos, son de frente convexa y sobresaliente con dos pequeños ocelos en medio de los ojos compuestos que son más protuberantes. Antenas cortas y cetáceas con dos segmentos basales cortos y el resto filiforme. Pronoto grande, hexagonal o trapezoidal. Sus colores son variados y pueden vivir entre 15 a 25 días (Vargas & Gómez, 2005).

El macho mide 11 mm de largo y 5 mm de ancho y presenta una coloración que va de castaño oscura a negro, con dos manchas transversales de color amarillo, continuas e intermitentes, separadas una de la otra de forma que dividen a las alas en tres partes iguales (Ver Figura 3). La hembra es

levemente más grande que el macho, con 13 mm de largo y 6,5 mm de ancho y presenta una coloración castaña y manchas amarillas más estrechas y menos definidas que en el macho.

Al aparearse los insectos después de 48 a 72 horas de emergido, y las hembras se aparean sólo una vez en su vida. El número de huevecillos que ovipositan en los tejidos de la base de la vaina de las hojas de caña adheridas al cogollo, varía de 30 a 114 huevos. El periodo de incubación de los huevecillos dura de 16 a 18 días de los cuales salen las ninfas muy activas y suben velozmente hacia el cogollo de la caña donde inician a chupar la savia para alimentarse (Mendonça, 2009).

2.3.2.2.3. Ciclo biológico de *M. andigena*. El insecto salivazo (cercópido), presentan una metamorfosis gradual o sencilla denominada paurometábola que se caracteriza por los estados de huevo, ninfa y adulto (ver Figura 3). Los individuos jóvenes o ninfas tienen una forma similar al insecto adulto (Grande, 2006; Madaleno, 2006; Cetino, 2008; Cuarán, 2012).



Figura 3. Ciclo de vida del salivazo de la caña de azúcar (Mahanarva andigena Jacobi).
Fuente: Castillo, 2006; Mendonça, 2009; CINCAE, 2012; Merino, 2015.

Las ninfas recién nacidas, trepan rápidamente hasta el cogollo de la caña de azúcar donde comienzan a nutrirse succionando la savia de los brotes más jóvenes, simultáneamente se recubren de una espuma (sustancia mucilaginosa excretada por las glándulas epidérmicas) para protegerse de sus enemigos naturales y condiciones ambientales adversas (Gómez *et al.*, 2007 y Cuarán, 2012). Las ninfas más jóvenes, se ubican dentro de las hojas jóvenes enrolladas, mientras que las viejas en la parte baja sobre las hojas viejas donde la vaina de la hoja empieza a separar del tallo (Peck *et al.*, 2004).

El ciclo del insecto es de $84,5 \pm 3,87$ días, con 4,5 generaciones al año, incidiendo en la reproducción las condiciones climáticas como: la temperatura, humedad relativa y precipitación del lugar para su desarrollo, siendo el factor climático que más se asocia a la reproducción del insecto plaga la humedad relativa, que en porcentajes de 88 y 90%, favorecen los altos niveles poblacionales alcanzados por la plaga durante los meses de marzo y abril (Valle, 2015).

En el Ecuador, se reporta como hospedero del salivazo (*Mahanarva andigena*) a la caña de azúcar, donde los primeros reportes se remontan a 1986 en el Ingenio San Carlos en el valle de Guayas (Rodríguez y Peck, 2007).

El salivazo (*Mahanarva andigena*) Jacobi (Hemíptera: Cercopidae) es una plaga importante de la caña en varias regiones del país, particularmente en la cuenca baja del Guayas (Naranjito, Milagro, Bucay), Zaruma (El Oro), Puyo (Pastaza), Esmeraldas, Tungurahua y Nanegalito (Pichincha). Se considera una especie nativa de pastos y malezas gramíneas que se ha adaptado eficientemente a la caña de azúcar (CINCAE, 2012).

2.3.3. Manejo integrado de plagas.

La utilización del manejo integral de plagas, es un conjunto de técnicas físicas, químicas, biológicas, genéticas y/o culturales, que permiten el control

en una población de los insectos plaga; coexistiendo el control biológico como parte del MIP (Shapiro-Ilan *et al.*, 2011).

2.3.3.1. Control biológico. Se fundamenta en la introducción de especies predatoras o parasitas beneficiosas en los agro ecosistemas de los cultivos donde estaban previamente ausentes o presentes en niveles poblacionales bajos (Tiago *et al.*, 2014). Dentro de este control se encuentra el microbiológico que consiste en el uso de los microorganismos como predadores de los insectos plaga. El control microbiano con los hongos entomopatógenos puede regular las poblaciones a través de aplicaciones inundativas, inoculativas o dispersivas (Mahdavi *et al.*, 2013). Se indica que los hongos entomopatógenos causan niveles altos de epizootias en la naturaleza, son los agentes más versátiles de biocontrol y son medioambientalmente seguros (Jitendra *et al.*, 2012).

Estos hongos pueden causar enfermedades a más del 80% de la población de insectos y presentan ventajas por su alta variabilidad genética, infectan a diferentes estados de desarrollo del hospedante, penetran a través del tegumento del insecto plaga y tienen capacidades elevadas de dispersión en el campo (Rossoni *et al.*, 2014).

La gestión de los hongos entomopatógenos, para el control microbiológico de insectos plaga en los cultivos mediante la utilización de los bio-insecticidas, constituye una alternativa que minimiza o elimina la utilización de agroquímicos tóxicos (Gómez, 2010) es factible para los productores (Quesada-Moraga, *et al.*, 2008). Dichas técnicas se ha desarrollado con el propósito de reducir los costos de la producción de los bioinsecticidas, evitar los daños al ambiente y al ser humano (Shapiro-Ilan *et al.*, 2011).

2.3.4. Hongos entomopatógenos.

2.3.4.1. Generalidades. Los hongos entomopatógenos, se derivan de las palabras: entomo (insecto) y entomófago (agente biótico que se alimenta de los insectos). Son microorganismos que provocan enfermedades en los

insectos y entre los agentes causales se localizan los virus, las bacterias, los hongos, los protozoos y los nemátodos, entre otros. Constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista sistemático y presentan diferencias en cuanto a su biología; frente a los insectos o artrópodos actúan por la vía tegumentaria y son virulentos, convirtiéndolos en un importante factor de regulación natural de sus poblaciones al coexistir con los insectos fitófagos en el mismo nicho ecológico (Roy *et al.*, 2010) con un proceso patogénico caracterizado por la secreción de distintos metabolitos insecticidas (Quesada-Moraga *et al.*, 2006).

Los hongos entomopatógenos han sido producidos en masa como biopesticidas desde la década del 1970. No obstante, los más exitosos son los Entomophthorales, pero se ha demostrado que son difíciles de producir en masa y formular. Por lo tanto, la mayoría de esfuerzos se han centrado en la búsqueda de especies que tienen la capacidad de producir con mayor facilidad, en especial los Ascomycetes de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* (Ascomycota: Hypocreales), *Isaria* y *Lecanicillium* (Sordariomycetes: Hypocreales). (Jandricic, 2014).

Un aspecto importante a considerar para obtener resultados satisfactorios en el uso de los hongos entomopatógenos, es la obtención de las cepas nativas para asegurar una mayor efectividad frente a las cepas exóticas, que podría no adaptarse a las condiciones ambientales y por lo tanto no resultar tan efectivas en el momento de ejercer su patogenicidad, incluso podría atentar contra la bioseguridad de los insectos no target (Hernández, 2015).

Los factores abióticos afectan la habilidad y rapidez con que el hongo puede infectar y colonizar a su hospedante (Matthew & Khan, 2013). En el campo la eficacia de los hongos entomopatógenos es mayormente dependiente de la existencia de condiciones climáticas favorables (bajas temperaturas menores a 30°C y alta humedad superiores a 70% (Ramanujam *et al.*, 2014). La germinación de los conidios empiezan a decrecer cuando la temperatura límite llega a 35 °C (Remadevi *et al.*, 2010).

Los hongos entomopatógenos, pertenecientes al género *Beauveria* han sido reconocidos como los agentes de biocontrol de las plagas importantes en los cultivos a nivel de campo e invernadero (Eyal *et al.*, 1994; Shahid, 2012).

2.3.4.2. Distribución y ecología. Los hongos entomopatógenos, se encuentran distribuidos en la mayoría de los ecosistemas terrestres, con más de 750 especies asociados a insectos, procedentes de diversos hábitats como el suelo, los insectos y los artrópodos, la filosfera (filoplano) y la endósfera (como endófitos) (Scheepmaker y Butt, 2010; Quesada-Moraga *et al.*, 2014a).

Los grupo de los hongos, son patógenos obligados o facultativos que se desarrollan a expensas de insectos de los diferentes órdenes en forma natural; se utilizan como productos de biocontrol, por ser fáciles de manipular, multiplicar, formular, poseen una capacidad elevada de esporulación y sobrevivencia; son efectivos en el control de plagas de importancia agrícola y son inocuos para otras especies y el ser humano (France *et al.*, 2016).

Esta diversa procedencia lleva asociadas distintas respuestas de los hongos entomopatógenos, a los factores bióticos y abióticos a los que se ven expuestos estos biocontroladores en los ecosistemas naturales y agroforestales (Quesada-Moraga *et al.*, 2007; Jaronski, 2010).

Para su desarrollo los hongos entomopatógenos, requieren una adecuada humedad, pH y temperatura para su natural dispersión e infección, dependiendo de cada especie de hongo. Actúan por contacto en los diferentes estadios de los insectos plaga. Los conidios, son las unidades infectivas, penetran al cuerpo del insecto, produciéndole alteraciones en todos los sistemas; desórdenes que enferman al insecto, deja de alimentarse y posteriormente muere (de tres a cinco días), dependiendo de la virulencia del hongo y estadio del insecto. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Ministerio de Agricultura (SENASA), 2014.

2.3.4.3. Clasificación y sistemática. Los nuevos análisis filogenéticos demuestran que dentro del reino Mycota los hongos entomopatógenos, se clasifican en dos divisiones, Entomophthoromycota y Ascomycota, donde se ubican los órdenes con el mayor número de representantes, Entomophthorales e Hypocreales, respectivamente (Gryganskyi *et al.*, 2012, 2013; Hibbett *et al.*, 2007; Humber, 2012).

Los Entomophthorales, con las familias Entomophthoraceae, Neozygitaceae, y Ancylistaceae, son biotrofos obligados de difícil multiplicación en medio artificial, lo que restringe su aplicación en el control biológico clásico (Keller, 2007; Pell *et al.*, 2010).

Los Ascomicetos, con las familias Clavicipitaceae, Cordycipitaceae y Ophiocordycipitaceae, son de fácil manejo en la producción en (Yadav, 2013) y revelan buena eficacia insecticidas lo que hace factible para la comercialización como mico insecticidas (Pell *et al.*, 2010).

Se han citado más de 750 especies reunidas en 100 géneros. Sin embargo, entre los entomopatógenos más importantes y conocidos tenemos la *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviridae*, *Verticillium leccanni*, *Paecilomyces sp*, *Nomuraea rileyi*, son comunes en el campo. Estos hongos tienen un amplio rango de hospederos y se han utilizado para controlar diversas plagas en los diferentes lugares (Humber, 2012).

A nivel mundial, estos géneros son los más estudiados, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación, estos hongos pueden ser utilizados como agentes entomopatógenos causantes de enfermedades u organismos que sirven como vectores de otros microorganismos que causan daño a plantaciones, animales y al propio humano (Scholte, 2004).

2.3.4.4. Patogenicidad. El hongo debe ser patógeno o capaz de matar al hospedador específico que se busca controlar. El proceso infectivo de los hongos entomopatógenos involucra un conjunto de interacciones complejas

con los insectos hospedantes que puede modificar entre las especies de hongos y entre las distintas cepas de la misma especie (Castrillo *et al.*, 2005). Ciertos hongos son patógenos obligados y sus ciclos de vida completos no han sido cultivados fuera de un insecto vivo. No obstante, la mayoría de los hongos entomopatógenos, son capaces de crecer fuera de un hospedante. Algunos son patógenos virulentos y matan al insecto dentro de pocos días; otros producen infecciones crónicas y prolongadas. La patogenicidad de un hongo, puede estar asociada con la producción de enzimas y mico toxinas durante el transcurso de la infección en un insecto (Tonada & Kaya, 1993).

La *B. bassiana* y *M. anisopliae*, poseen un gran potencial para infectar a un numeroso grupo de los artrópodos (Smriti *et al.*, 2015). Su manejo se ha generalizado en todo el planeta como bio pesticidas para el control de las diversas plagas, estos hongos bajo condiciones naturales son los patógenos que con frecuencia pueden controlar a los insectos plaga que originan deterioro a los cultivos agrícolas y constituyen el grupo de mayor importancia del biocontrol (Escamilla *et al.*, 2016) y causan la mortalidad a poblaciones de insectos en diferentes agro ecosistemas (Faria & Wraight, 2007).

Los hongos al infectar a los hospedantes producen metabolitos, como los depsipéptidos cíclicos y las enzimas hidrolíticas que degradan la cutícula del insecto y artrópodo; igualmente, estos entomopatógenos al encontrarse en los nichos ecológicos con alta biodiversidad y competencia cumplen con la función de controladores biológicos de las plagas. (García, 2015).

Todos los compuestos bioactivos anotados pueden ser utilizados y producidos como bioplaguicidas sobre sustratos sólidos naturales o artificiales, tales como los cereales a través de los procesos fermentativos, esto abre nuevas áreas de desarrollo agro biotecnológico, acorde con las nuevas tendencias de la investigación agrícola a nivel mundial; asimismo los hongos entomopatógenos, son competitivos con otras prácticas de control, considerando su efectividad, costo de producción y seguridad al ambiente (García, 2015).

2.3.4.5. Metabolitos insecticidas del hongo entomopatógeno. Estos hongos, poseen la capacidad de secretar metabolitos tóxicos durante el ciclo de infección. Los metabolitos, poseen distintas propiedades bioactivas como son: insecticida, acaricida, nematocida, antibiótica, anti fúngica, cito tóxica, mutagénica o ser factores de la virulencia de estos agentes de control (Quesada-Moraga *et al.*, 2014a).

Por lo tanto, es de suma importancia, conocer el modo de acción de dichos compuestos, debido a que pueden poseer un gran valor para la industria de agroquímicos o farmacéutica.

2.3.4.5.1. Metabolitos secundarios de bajo peso molecular. Son aquello que miden menos de 5000 Dalton (Da), producidos principalmente por los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Tolypocladium*, *Paecilomyces* y *Cordyceps*, e incluyen a los poliquétidos: oosporeina, cordiol C, diorcinol, violaceol-I y -II, naftopirano, emodina, bassianolona, cefalosporolidos, aurovertinas, micestericinas, esfingofunginas, flavo virinas. Los péptidos no ribosomales: leucinostatinas, culicininas, efrapeptinas, diketopiperazinas, bassiatina, beauverolidas, destruxinas, cyclosporinas, beauvericina, enniatinas, bassianolida, farinosonas, ophiocordina. Los terpenoides: paecilomycinas, ascochlorinas, aphidicolina, metarhizinas, ácido helvólico. Otros: cordycepina o la familia de las maleimidias (Molnár *et al.*, 2010).

Los metabolitos secundarios, son compuestos cíclicos hexadepsipéptidos de un ácido-hidroxilo y cinco aminoácidos residuales (Pedras *et al.*, 2002). Las destruxinas son las más frecuentes y numerosos, el género *Metarhizium*, produce a menudo estos compuestos de actividad insecticida y fitotóxica; así como efectos subletales en la reproducción de aquellos insectos que sobreviven al tratamiento (Lozano-Tovar *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las destruxinas (dimetil dextruxina y protodextruxina), inhibe la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN) y las proteínas en las células de los insectos (Pucheta *et al.*, 2006). El interés por las destruxinas, deriva especialmente de su potencial como

factores de la virulencia para el control biológico de plagas (Skrobek *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2013; Tseng *et al.*, 2014; Taibon *et al.*, 2015).

2.3.4.5.2. Proteínas de alto peso molecular. La hirsutelina A (miden 15 KDa, producida por el hongo *Hirsutella thompsonii* Fisher (Mazet & Vey, 1995), la bassiacridina (60 KDa) originada por la *B. bassiana* (Quesada-Moraga & Vey, 2003). En esta década, se ha revelado y caracterizado una nueva proteína insecticida desde *Metarhizium sp.*, designados como proteína(s) secretada(s) tóxica (s) para los insectos 1 (SIT1), que promueve la melanización y la muerte celular en el insecto (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2009; 2013; Tseng *et al.*, 2014).

El extracto bruto del aislado EAMa 01/58-Su de *M. brunneum* está compuesto por tres proteínas/péptidos de 15/15/11 KDa que han exhibido una gran toxicidad frente a dípteros y lepidópteros, pero su completa purificación aún no se ha podido llevar a cabo (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2009; Quesada-Moraga *et al.*, 2006a; Resquín-Romero, 2016).

2.3.4.6. Principales ventajas y desventajas de los hongos entomopatógenos. Entre las principales ventajas, se tienen: presentan grados variables de especificidad, pueden serlo a nivel de familia o especies muy relacionadas. Si el hongo entomopatógeno se halla en condiciones propicias para introducirse y colonizar un ecosistema se reproduce y renueva en forma continua por sí solos. No contaminan el ambiente ni a los seres vivos superiores, incluido el hombre. Se pueden aplicar mezclas de entomopatógenos con dosis subletales de insecticidas, logrando efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones individuales. Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo del ciclo de vida del insecto (Kamp & Bidochka, 2002; Glare, 2004).

Entre las desventajas tenemos: la sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como las temperaturas extremas, la desecación y la radiación ultravioleta. No eliminan súbitamente a la plaga. Alcanzan buenos

niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar la pérdida de la patogenicidad. No obstante, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, no se alimenta normalmente disminuyendo así el daño a la planta y luego muere, (Ames & Cañedo, 2004).

2.3.5. *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin 1912.

2.3.5.1. Generalidades. El hongo anamórfico *B. bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) fue descrito por Agostino Bassi a principios del siglo XIX como el agente causal de la enfermedad muscardina blanca de los gusanos de seda (*Bombix mori*). Es un hongo que se encuentra distribuido abundantemente en la naturaleza, tiene un amplio espectro de hospedantes, por lo cual es utilizado a nivel mundial como biocontrolador de los insectos plaga debido a su estabilidad fuera del hospedante y en los aislados fúngicos. Se demostró por primera vez que los microorganismos podrían ser los agentes causales de las enfermedades (Zimmermann, 2007).

La *B. bassiana*, es un hongo ascomycete cosmopolita capaz de habitar una amplia gama de ambientes, incluyendo el suelo, los insectos y las plantas. El hongo vive como saprofito en el suelo, endófito en las plantas y como un entomopatógeno cuando afecta a un numeroso grupo de los artrópodos (Boomsma *et al.*, 2014), es haploide y normalmente se reproduce asexualmente, aunque puede reproducirse sexualmente en un estado teleomórfico, llamado *Cordyceps bassiana* (Sung *et al.*, 2006).

El hongo entomopatógeno más utilizados para el control de plagas es la *B. bassiana*, ataca a más de 200 especies de insectos de los diferentes órdenes, incluyendo las plagas de gran importancia agrícola, entre ellos la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano (Monzón, 2001).

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies: la *B. bassiana*, la *B. brongniartii*, la *B. tenella*, la *B. amorpha* y la *B. velata*; sin embargo, las más estudiadas son la *B. bassiana* y la *B. brongniartii* (González & Molina, 1997).

La *B. bassiana* ha mostrado un potencial como agente de biocontrol de los insectos y el conocimiento de los mecanismos de la virulencia es esencial para demostrar la eficacia de su utilización. Con la reciente disponibilidad de toda la secuencia genómica de la *B. bassiana*, el avance en la comprensión de la genética que constituye la virulencia hacia los insectos se puede hacer más rápidamente el control de los insectos plaga (Valero, 2016).

2.3.5.2. Taxonomía de la *B. bassiana*. La taxonomía del hongo entomopatógeno (ver Cuadro 3).

*Cuadro 3. Taxonomía de la *B. bassiana*.*

Reino:	<i>Fungi</i>
Phylum:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Clavicipitaceae</i>
Género:	<i>Beauveria</i>
Especie:	<i>Beauveria Bassiana</i>

Fuente. Datos tomados de NCBI taxonomy data base (2013).

2.3.5.3. Características morfológicas de *B. bassiana*. La colonia en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), a los 14 días, presenta un aspecto algodonoso brillante o polvoriento, el matiz es blanco y a medida que transcurre el tiempo se torna amarillenta o cremosa; los bordes son bien definidos, la superficie es plana o elevada. El envés del cultivo en la caja de Petri es de matiz rojizo al centro y amarillento (ver Figura 4). (Merino, 2015).

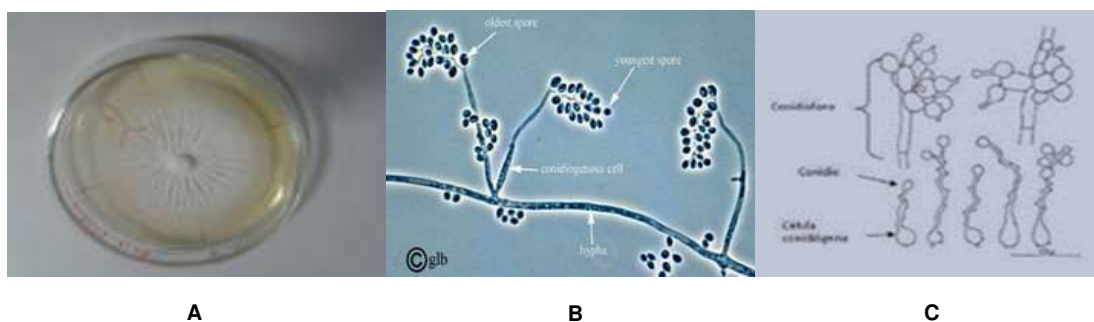


Figura 4. Morfología macroscópica y microscópica del crecimiento experimental de *Beauveria bassiana*. Fuente. **A:** Merino (2016), **B:** Luque (2011) y **C:** Nussenbaum (2014).

El hongo visto al microscopio, las hifas son septadas de 2,5 a 25 μm de diámetro. Se caracteriza por la presencia de conidióforos sencillos, cerca de 1-2 μm de diámetro están irregularmente agrupados o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene el conidio (en forma de zigzag), después de que varios conidios se producen, éstos son hialinas, esféricas (en medios aerobios) a ovoides y unicelulares (en medios anaerobios), llamadas blastósporas, miden alrededor de 2 a 3 x 2 a 2.5 μm (González, Molina, & Lezama, 1997).

Los conidios germinan a una temperatura de 25°C-30°C, el pH óptimo de crecimiento es 5.7-5.9 y para la generación de los conidios en el rango de 7-9 días (Garza, 2008).

2.3.5.4. Ciclo de la infección del insecto por *B. bassiana*. El desarrollo de la patogénesis (micosis) en el ciclo de infección del insecto, se inicia cuando el conidio entra en contacto con su hospedador. El ciclo se divide en dos fases: A (la parasítica) y B (la saprófita) (Valero, 2016). El proceso y mecanismos de infección desplegados por este hongo entomopatógeno que influyen en la virulencia hacia la plaga (ver Figura 5).

Fase [A]

Paso ① el proceso de infección se inicia cuando el conidio de *B. bassiana* por contacto se adhiere a la cutícula del insecto plaga por mecanismos hidrofóbicos para inducir la germinación y la formación de un tubo germinativo

y en casos particulares el apresorio. En el ② las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula deben ser rotas para la penetración física de las hifas al interior del cuerpo del insecto, es la primera barrera que el hongo debe traspasar mediante una combinación de presión mecánica y degradación enzimática (proteasas, lipasas y quitinasas). (Ortiz *et al.*, 2010; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013): En el ③ después de la penetración el hongo cambia al crecimiento de blastósporas para colonizar el hemocele del huésped: En el ④ las células blastósporas circulan libremente a través del hemocele, donde explotan la hemolinfa para la nutrición y la secretan toxinas que facilitan la muerte del huésped. En el ⑤ la invasión exitosa del insecto requiere que las blastósporas (células fúngicas) evadan o superen las respuestas inmunes del huésped y siguen secretando las toxinas que facilitan la muerte del huésped. Finalmente, en el ⑥ cuando el huésped muere (fase final de la enfermedad) la cutícula debe ser rota nuevamente desde el interior para permitir la salida de los conidios del cuerpo del insecto y esporular en el cadáver (Valero, 2016).

Fase [B]

En el paso ⑦ el crecimiento micelial del hongo entomopatógeno emerge de los costados del insecto y de las partes membranosas de la región bucal, el conjunto de conidióforos alcanzan a cubrir todo el cuerpo excepto las áreas quitinizadas como son los élitros y la parte superior del pronoto; en último lugar, los conidios se dispersen al ambiente y se inicia un nuevo proceso de infección (Goettel *et al.*, 2005; Charnley & Collins, 2007; Valero, 2016).

En el laboratorio la *B. bassiana* emerge y esporula de cualquier parte del insecto, mientras que cuando la infección ocurre en el interior del fruto del café, el micelio envuelve totalmente el cuerpo de la *Hypothenemus hampei* y la esporulación ocurre con mayor abundancia en la parte exterior del orificio de la entrada de la cereza (fruto del café) sin llegar a invadir el tejido vegetal. La muerte del insecto ocurre en un período de 2 a 9 días aproximadamente (Méndez & Rosas, 1998; Merino, 2015).

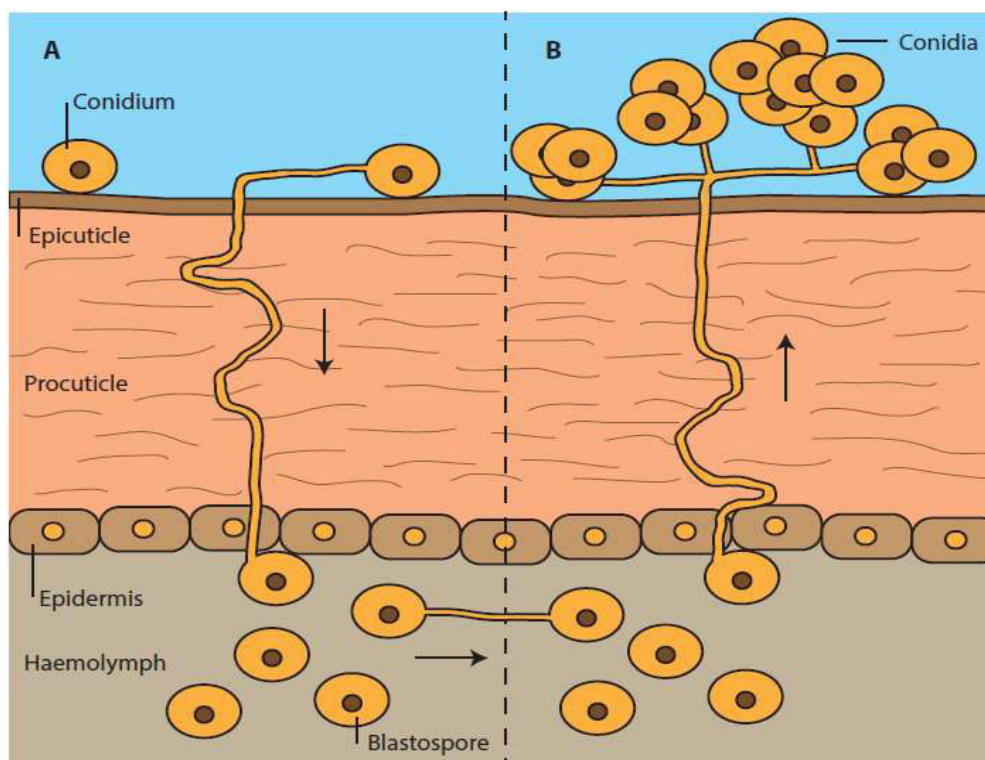


Figura 5. Infection cycle of *B. bassiana* in insects. Adapted from Clarkson and Charnley (1996) by Valero (2016). (A): Step 1-6 y (B): Step 7. Valero (2016).

2.3.6. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin.

2.3.6.1. Generalidades. El hongo *M. anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), por su amplio espectro de acción hacia los hospedantes y por su alta capacidad de adaptación a las diferentes condiciones ambientales, es calificado de entomopatógeno cosmopolita, contrastado con la acción específica que posee *Metarhizium acridum* sobre sus hospedantes (Pattemore *et al.*, 2014).

El suelo es hábitat natural de *M. anisopliae*, donde crece saprofiticamente y existen los conidios en dormancia que infectan desde allí a los hospedantes susceptibles al ponerse en contacto (Glare *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que en los suelos franco arcillosos y provenientes de las pasturas; así como, en los márgenes de los suelos cultivados se han encontrado altas densidades y permanencia del hongo (Tiago *et al.*, 2014).

El *M. anisopliae* es el segundo hongo más estudiado después de *B. bassiana*, por ser eficaz y fácilmente propagado (Schapovaloff *et al.*, 2014). Tiene una amplia distribución geográfica y causa enfermedad natural a más de 200 especies de insectos plaga de varias órdenes: la Hemíptera, la Díptera, la Coleóptera, la Lepidóptera, la Orthóptera e Hymenóptera (Tangthirasunun *et al.*, 2010; Jitendra *et al.*, 2012; Ramanujam *et al.*, 2014).

El género *Metarhizium* pertenece al filo Ascomycota, su fase de reproducción es asexual (anamorfo) o sexual (tele morfo) llamada *Cordyceps sp.* Por otro lado, se indica que la filogenia del género *Metarhizium* está evolucionando y hallaron que las investigaciones en sistemática molecular, pueden establecer cambios significativos en la taxonomía de estos hongos. Así mismo, se confirma que *Metarhizium* es un grupo monofilico (Tangthirasunun *et al.*, 2010; Pereira de Lyra *et al.*, 2012).

El *M. anisopliae*, se identifica por ser un mesófilo, tiene una germinación y crecimiento óptimo a la temperatura de 25 a 30°C una máxima de 32 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C; puede vivir *in vitro* en un pH de 3.3 a 8.5, se requiere de humedad elevada para el crecimiento de conidios. La presencia de oxígeno (O₂) elevada y la deficiencia en bióxido de carbono (CO₂), favorece la supervivencia de los aislamientos (Ramírez, 2016).

Otro entomopatógeno muy importante es el *Metarhizium bipars*, se utiliza en Brasil como un modelo para el estudio del control biológico de insectos plaga salivazo que afecta a la caña de azúcar, así como a otras plagas (Dalla Pria y col., 2008). El amplio rango de hospederos que controla, hace del género *Metarhizium sp.*, comercialmente más atractivo como agente de control microbiológico (Pik *et al.*, 2009).

Al presente, se han registrado once especies del género *Metarhizium*: *anisopliae*, *robertsii*, *acridum*, *album*, *majus*, *guizhouense*, *brunneum*, *flavoviride*, *flavoviride var.*, *pemphigi*, *pingshaense* y *lepidiotae* (Bischoff *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2014; Pattemore *et al.*, 2014).

Los análisis moleculares recientes al complejo *M. anisopliae* han permitido la división en nueve especies diferentes, las que en forma individual pueden poseer hospedantes específicos limitados. En una filogenia multigenes, el agrupamiento de *M. anisopliae* con las especies *M. pingshaense*, *M. robertsii* y *M. brunneum*, formaron un distinto clade (PARB). (Kepler *et al.*, 2012).

El *M. anisopliae*, se usa como un prototipo de las interacciones insecto-hongo y como un recurso de genes para la biotecnología (Gao *et al.*, 2011). Además, se le consideran como entomopatógeno de interés comercial significativo por la utilización en aplicaciones industriales en la formulación de biopesticidas (Pattemore *et al.*, 2014).

2.3.6.2. Taxonomía de *M. anisopliae*. La taxonomía del hongo entomopatógeno (ver Cuadro 4).

Cuadro 4. Taxonomía del *M. anisopliae*.

Reino:	<i>Fungí</i>
Phylum:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hipocreales</i>
Familia:	<i>Clacicipitaceae</i>
Género:	<i>Metarhizium</i>
Especie:	<i>Metarhizium anisopliae</i>

Fuente. Datos tomados de NCBI taxonomy data base (2013).

2.3.6.3. Características morfológicas. El *M. anisopliae* en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar, en el haz de las placas de Petri las colonias son blancas cuando jóvenes, pero al madurar el matiz se torna verde aceituna, en el envés su matiz va de mostaza a café oscuro (Merino, 2015). Además, presentan pigmentación que permiten hacer diferenciaciones del género; el micelio de este hongo es septado de allí se desprenden los conidióforos, agrupados sobre un extremo globoso. Las fiálides se observan en empalizada de forma cilíndrica y aplastada en la base. (Ver Figura 6).

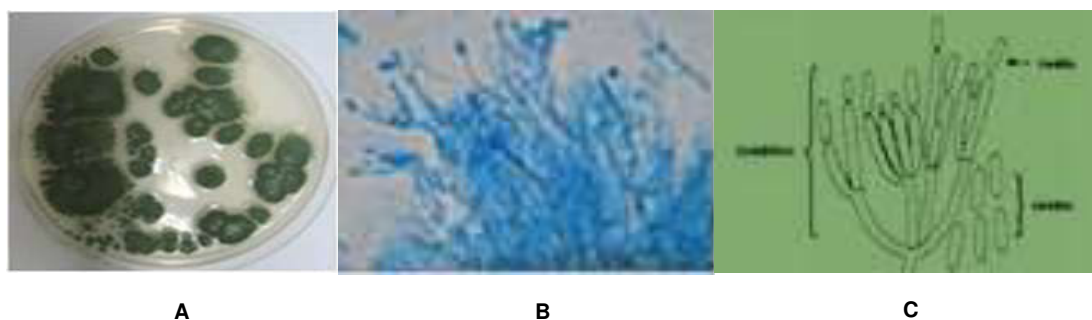


Figura 6. Morfología macroscópica (A) y microscópica del crecimiento experimental de *M. anisopliae*. (B y C) Fuente. Pik-Kheng y col., (2009) y Nussenbaum, A (2014).

Los conidios se disponen en cadenas compactas paralelas que se forman en cada conidióforo, su forma es cilíndrica y sus extremos ovals, son unicelulares, de dimensiones variables de 3,5 a 9 μm de largo; la adherencia del conidio al hospedante varía con la familia del hongo (Humber, 2012).

El *M. anisopliae*, tiene un alto grado de especialización que ocurre casi enteramente en dos familias de coleópteros, *Elateridae* y *Curculionidae*; sin embargo, se ha manifestado su parasitismo igualmente sobre otras especies, de las órdenes ortóptera, hemíptera, coleóptera (*Scarabaeidae* y *Curculionidae*) y dermáptera (Zimmermann, 1993). Además, en especies de coleópteros predadores como escarabeidos y estafilínidos (Steinnberg, 1995).

2.3.6.4. Ciclo de infección del insecto por el *M. anisopliae*. El ciclo completo de infección del *M. anisopliae*, se inicia con la adhesión del conidio en la cutícula del insecto hospedante, seguido por la germinación y la hifa que emerge y penetra a través de la cutícula, e invade la hemolinfa, el hongo se desarrolla dentro del cuerpo del insecto y mata al insecto después de unos pocos días. La cutícula del cadáver a menudo se pone roja (Dayakar & Subbarao, 2011; Rustiguel *et al.*, 2012).

Posterior a la muerte del insecto por la infección, que varía de 2 a 15 días después de la manifestación de la misma, dependiendo de la cepa agresora, la especie fúngica y exclusivamente por las características del insecto hospedante (Rai *et al.*, 2014) el hongo comienza a salir de adentro hacia fuera

del tegumento y forma el micelio aéreo blanco, que luego se torna verde por la producción de los conidios (Ramanujam *et al.*, 2014; Ramanuj, 2015).

Los factores abióticos afectan la habilidad y rapidez con que el hongo entomopatógeno puede infectar y colonizar al insecto huésped (Matthew y Khan, 2013). En el campo la eficacia del patógeno depende mayormente de la existencia de las condiciones climáticas favorables, las temperaturas menores a 30 °C, HR alta y los porcentajes superiores al 70%. (Ramanujam *et al.*, 2014). La germinación de los conidios decrecer por encima de una temperatura límite de 35 °C (Remadevi *et al.*, 2010).

La enfermedad causada por el hongo *M. anisopliae* es conocida como la “muscardina verde” debido al color verde de sus conidios. La interacción entre el patógeno y el hospedante está influenciado por diferentes factores como la producción de las enzimas, la capacidad de secretar compuestos tóxicos (metabolitos) durante el ciclo de infección, la temperatura ambiental, la humedad, la luz y la radiación ultravioleta, sí como, las condiciones nutricionales y la susceptibilidad del hospedante (Rustiguel *et al.*, 2012).

2.3.6.5. Toxinas sintetizadas por *M. anisopliae*. El hongo entomopatógeno tiene la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedero. Las toxinas son sustancias químicas muy tóxicas para artrópodos, por lo que pueden causar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas, acariciadas y nematocidas (Rustiguel *et al.*, 2012; Valero, 2016).

También actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del insecto. La producción de toxinas es una característica de todos los hongos y cepas. Las toxinas producidas pueden ser de dos tipos: ① las macromoléculas proteicas y ② las sustancias de bajo peso molecular. Las primeras son enzimas secretadas en cantidades significativas tanto en medios de cultivo como en el cuerpo del insecto. La serilproteasa y sulfidrilproteasa, han sido aisladas de *Metarhizium*; otras enzimas encontradas son las lipasas, las

glicogenasas, las amilasas y las quitinasas (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010; Dayakar & Subbarao, 2011).

El segundo tipo corresponde a los metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pero que puede ser afectada por factores como los nutrientes, el pH, la temperatura y otros. Las toxinas más comunes de este tipo son principalmente las destruxinas, la demetildestruxina y la protodestruxina. Fundación para el Desarrollo Tecnológico, Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA, 2015).

2.3.7. Medios de cultivo para aislar los hongos entomopatógenos.

Los microorganismos en su hábitat natural son capaces de mejorar su papel de recicladores de la materia orgánica e inorgánica, ya que existen diversas especies y diferentes requerimientos metabólicos, razón por la cual es importante entender el comportamiento de los microorganismos no solamente en sus ambientes naturales, sino también el comportamiento en el laboratorio para de este modo manejarlos óptimamente y proporcionarles los nutrimentos necesarios para su crecimiento (Leucoma, 2014).

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de los hongos, es la observación de su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo. Las condiciones para que se desarrollen son: la temperatura, el grado de humedad y la presión de oxígeno adecuada, un grado correcto de acidez o alcalinidad; los nutrientes, los factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (Herrera, 2005).

La formulación de un medio de cultivo debe proporcionar una mezcla balanceada de los nutrientes en niveles adecuados que permitan el desarrollo de los mismos. Para el aislamiento y la producción de hongos entomopatógenos en el laboratorio existen diversos medios de cultivo: el agar,

la fito levadura, el Sabouraud Dextrosa Agar, la miel de peptona, la Papa Dextrosa Agar (Cañedo & Ames, 2004).

Existen una diversidad de medios de cultivo para la producción *in vitro* de los hongos entomopatógenos, pero los más utilizados son los que se describen a continuación.

2.3.7.1. Agar - Agar. Es un componente solidificante vegetal de origen marino usado en la preparación de los medios de cultivo. Está compuesto de un polisacárido sin ramificaciones, obtenido de la pared celular de varias especies de algas de los géneros: *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria*. El agar, se licúa totalmente a la temperatura de ebullición del agua y se solidifica al enfriarse. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él (Herrera, 2005).

2.3.7.2. Sabouraud dextrosa Agar (SDA). Es un medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos, en especial dermatofitos. Se logra selectividad mediante la adición de cloranfenicol (Sabouraud, 2015).

2.3.7.3. Papa dextrosa agar (PDA). Es el medio de cultivo complejo y el más utilizado, se emplea para el conteo de levaduras y hongos en general. Su composición química aproximado es: Agar (15 g), dextrosa (20 g), infusión papa (4 g) y agua destilada 1 litro. (kim & kim, 2002).

2.3.7.4. Medio de cultivo de mantenimiento de la *B. bassiana*. Es el agar medio completo (AMC), compuesto por (g/L): fosfato mono potásico (KH_2PO_4) 0,4; fosfato di sódico anhidro (Na_2HPO_4) 1,4; sulfato de magnesio (Mg SO_4) 0,6; cloruro de potasio (KCl) 1; nitrato de amonio (NH_4NO_3) 0,7; glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 10; extracto de levadura 5; Agar 20. Para *M. anisopliae*, se utiliza Agar Papa Glucosado (APG; Oxoid). (Nussenbaum, 2014).

2.3.7.5. Medio de cultivo líquido para inocular a los sustratos sólidos. Debe contener la glucosa (fuente de carbono), el extracto de levadura, (fuente

de nitrógeno) y el fosfato ácido de di potasio (fuente de minerales). La composición nutricional del medio líquido para la evaluación del crecimiento del cultivo y la formación de propágulos del entomopatógeno, es la fórmula anterior más el cloruro de calcio; sulfato de magnesio y hierro. Además, los metales trazas de cobalto, manganeso y zinc. Vitaminas del complejo B; ácido pantoténico, tiorico y fólico; niacina y biotina (Jaronsky & Jackson, 2012).

2.3.8. Sustratos sólidos para la producción en masa de los hongos entomopatógenos.

Son los soportes naturales o artificiales (sílica, arena) que los hongos utilizan para el crecimiento de los conidios aéreos. Los sustratos sólidos orgánicos naturales lo constituyen todos los granos de cereales y leguminosas como fuentes de almidón, celulosa y fibra. Una vez hidratado y esterilizado el grano absorbe fácilmente los nutrientes del cultivo líquido que proporciona los requisitos necesarios para la producción de biomasa sana. Los hongos filamentosos descomponen el almidón excretando altas concentración de enzimas hidrolíticas desde la punta hifal para penetrar en los nutrientes del sustrato iniciando la actividad metabólica y el rápido desarrollo del micelio y los conidios (Bartlell & Jaronsky, 1984).

Usualmente, se utiliza el arroz (*Oryza sativa*. L) y cebada (*Hordeum vulgare*), donde la *B. bassiana* y el *M. anisopliae* penetrarán y utilizarán el grano hidratado con facilidad al absorber todos los nutrientes líquidos con eficiencia; de manera que se disgreguen bien en gránulos individuales que proveen una gran superficie, mantengan un gradiente de humedad y no se descompongan en partículas diminutas que puedan mezclarse con el producto (Jenkins & Goettel, 1997; Raimbault, 1998; Sahayaraj & Namachivayam, 2008).

La heterogeneidad de los lechos del sustrato es el único inconveniente en la fermentación en estado sólido (FES), reto que puede ser modificado aumentando el área superficial y la mezcla diaria de los gránulos para facilitar la ramificación de los micelios durante las primeras etapas de crecimiento

vegetativo. Para promover el metabolismo que optimiza la producción de las esporas, se usan las bolsas Spawn puesto que ofrecen el intercambio de aire a baja presión, la actividad moderada del nivel de agua y la presión osmótica, parámetros propicios para el desarrollo de los factores fisiológicos, enzimológicos y bioquímicos, propiedades necesarias que estimulan el crecimiento microbiano final (Jaronsky & Jackson, 2012).

Existen cepas del género *Beauveria* y *Metarhizium* que no se reproducen bien en la FES, los hongos que exhiben tasas bajas de crecimiento están en riesgo con los microorganismos competitivos. Algunos aislamientos producen demasiado calor durante la fermentación y requieren la instalación de un sistema de enfriamiento para mantener la temperatura del lecho. Otros producen un micelio que une el sustrato, minimiza la superficie y la producción de las esporas que perturba al gradiente de humedad e incluso la distribución del intercambio de gases para el metabolismo (Grace & Jaronsky, 20005).

2.3.8.1. Sustratos sólidos arroz y maíz. Existe una amplia variedad de cereales, entre ellos se encuentran, el arroz (*Oryza sativa*. L), la cebada (*Hordeum vulgare*), el maíz (*Zea mays* L.), la avena (*Avena sativa*) y el trigo (*Triticum spp*). Sin embargo, en la actualidad los granos más utilizados en la producción en masa de los conidios aéreos en los hongos Hypocreales son el arroz y el maíz (Sahayaraj & Namachivayam, 2008; Jaronsky, 2012).

La composición de arroz y maíz, en 100 g de peso seco (ver Cuadro 5).

Cuadro 5. Composición química del arroz y maíz.

Contenido/100g	Arroz grano pulido	Maíz grano partido
Agua %	13,00	12,00
Calorías	360	362
Proteínas gr	6,80	9,00
Grasas gr	0,70	3,40
Carbohidratos gr	78,90	74,50
Almidón, fibra gr	0,20	1,00
Cenizas gr	0,60	1,10
Calcio mg	6,00	6,00
Hierro mg	0,80	1,80
Fósforo mg	140	178
Tiamina mg	0,12	0,30
Riboflavina mg	0,03	0,08
Niacina mg	1,50	1,90

Fuente. **Hernández. (2010).**

2.3.9. Suplementos nutritivos.

Los suplementos nutritivos, se emplean en el laboratorio y la industria para el crecimiento del hongo entomopatógeno; por lo que, es preciso el control de la población celular y el conocimiento de cómo se reproducen. Así mismo, las condiciones abióticas que necesitan y los requerimientos nutricionales son indispensables al momento de diseñar los métodos de control para el crecimiento masivo microbiano (Grace & Jaronski, 2005).

Los principales requerimientos nutricionales para la producción de los conidios son: el carbono, el fósforo y las fuentes de nitrógeno. Conjuntamente una adecuada temperatura, pH, actividad del agua y el intercambio los gases (CO₂ y O₂). Existen varios medios, los más comunes son: los líquidos, el agar y las FES (Jaronsky, 2012). La relación carbono-nitrógeno (C: N) en el medio o sustrato sólido es uno de los parámetros más críticos para aumentar la producción de los conidios, porque afecta en gran medida el crecimiento del hongo y la esporulación (Kruger *et al.*, 2014).

Se describen a continuación los suplementos nutritivos que se utilizaron en la producción en masa de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el laboratorio.

2.3.9.1. Melaza. Es una mezcla líquida compleja, densa y viscosa de color oscuro; es un subproducto de la refinación de la sacarosa de la caña de azúcar. Contiene la sacarosa, un azúcar invertido, las sales y otros compuestos solubles en álcali. Además, la glucosa, la fructosa y la rafinosa, las cuales son fermentables, también sustancias reductoras no fermentables. (Honig, 1974). La composición química de la melaza (ver Cuadro 6).

Cuadro 6. Composición química de la melaza.

Componentes	Constituyentes	Contenido (p/p %)
Componentes mayores	Materia seca	78.0
	Proteínas	3.0
	Sacarosa	60-63 % p/p
	Azúcares reductores	3.0-5.0 % p/p
	Sustancias disueltas (no azúcares)	4.0-8.0 % p/p
	Agua	16.0
	Grasa	0.40
	Cenizas	9.0
	Calcio	0.74
	Magnesio	0.35
Contenido de minerales	Fósforo	0.08
	Potasio	3.67
Componentes	Constituyentes	Contenido (ppm)
Contenido de aminoácidos y vitaminas	Glicina	0.10
	Leucina, Lisina y Treonina	0.01
	Valina	0.06
	Colina	0.02
	Niacina	600 ppm
	Ácido pantoténico	48.86 ppm
	Piridoxina	42.9 ppm
	Riboflavina	44.0 ppm
	Tiamina	4.4 ppm

Fuente. Swan. (1990)

2.3.9.2. Harina de amaranto (*Amaranthus duvius* Mart. Ex Thell). El amaranto es un alimento funcional, de proteínas de alto valor biológico. Contiene: el calcio, el ácido fólico y la vitamina C. También, posee abundante lisina, aminoácido esencial que está en baja proporción en los demás cereales. Posee el doble de la lisina que el trigo, el triple que el maíz y tanta lisina como la que se encuentra en la leche. Una combinación de arroz y amaranto, en una proporción de 1:1 ha sido reportada como excelente para alcanzar las especificaciones de las proteínas recomendada por día; razón por la cual es utilizado como suplemento nutritivo (OMS, 1997). La composición química de la semilla de amaranto (ver Cuadro 7).

Cuadro 7. Composición química de la semilla de amaranto en 100 g de la parte comestible y en base seca.

Análisis proximal (g)	g/100
Proteína cruda	12 - 19
Carbohidratos	71,80
Lípidos	6,1-8,1
Fibra cruda	18,30
Fibra	3,5 - 5,0
Cenizas	3,0 - 3.3
Energía (kcal)	391
Vitamina C (UI)	1.50

Fuente. Modificado de Montero-Quintero et al. (2011).

2.3.9.3. Harina de soya (*Glycine max* L.). Es un polvo fino que se obtiene del tostado y el molido de las semillas, contiene muy poco almidón. Se usa en forma de tortas para enriquecer de proteínas los piensos para los animales, se añade a otras harinas obtenidas a partir de los cereales para mejora el valor nutricional de las mismas al compensar su déficit en el aminoácido lisina. Su contenido en lecitina es elevado (100 g de harina contiene más lecitina que una media docena de huevos). La composición química (ver Cuadro 8).

Cuadro 8. Composición química en base seca de la harina de soya.

Humedad	39.23
Proteína	5.58
Grasa	24.27
Fibra	5.34
Ceniza	4.57
Carbohidratos	21.01

Fuente. Polit. (2013).

2.3.9.4. Leche entera en polvo. Por desecación de la leche se obtiene leche en polvo, casi libre de agua, de color blanco a blanco amarillento, se la puede preparar a partir de leche entera, leche descremada, leche ácida y también de crema. El objetivo de eliminar el agua de la leche es facilitar el almacenamiento, transporte e incrementar su vida útil. La composición química (ver Cuadro 9).

Cuadro 9. Composición química de la leche en polvo entera.

Parámetros	Gramos/100 g
Proteína	24.90
Humedad	2.51
Grasa	29.42
Ceniza	5.40
Carbohidratos	37.27

Fuente. Polit. (2013).

2.3.9.5. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen).

Las levaduras son organismos anaerobios unicelulares microscópicos, de forma circular u ovoide, de tamaño entre 2 a 4 μm , responsables de la mayoría de los procesos de fermentación alcohólica, se nutren de glúcidos y capaces de seguir dos rutas metabólicas para obtener la energía necesaria para llevar a cabo sus procesos vitales: la fermentación alcohólica y la respiración aerobia. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30 °C. La composición química de la levadura (ver Cuadro 10).

Cuadro 10. Componentes típicos de las levaduras.

Componentes	Porcentaje (%)	Componente	Porcentajes (%)
Proteínas	45.0-55.0	Calcio	0.6-1.3
Glúcidos	25.0-35.0	Fósforo	1.4-1.7
Grasas	2.0-5.0	Potasio	1.2-1.9
Cenizas	6.0-8.0	Magnesio	0.1-0.2
Hierro	9.3-35.0 mg	Cobre	2.0-13.4 mg
Molibdeno	1.3-12.3 mg	Zinc	3.3-16.3 mg

Fuente. (Foster M.E.) Foster y col., 1969; Zalashko (1990).

Las levaduras, son muy ricas en vitaminas del complejo B y su contenido en ácidos nucleicos es bajo, está en el rango de 4 a 10% (Petrenko, 2005).

También, poseen un contenido de proteínas inferior al 60%, no obstante la concentración de aminoácidos esenciales como la lisina, el triptófano y la treonina es satisfactoria aunque la concentración de metionina y cisteína es inferior. El contenido de los aminoácidos en el extracto de levadura, expresado en porcentaje de proteínas (ver Cuadro 11).

Cuadro 11. Contenido de aminoácidos del extracto de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Aminoácidos	Porcentaje	Aminoácidos	Porcentajes
Lisina	8.2	Valina	5.5
Histidina	4.0	Isoleucina	5.5
Arginina	5.0	Tirosina	5.0
Lisina	7.9		

Fuente. Elinov (1995).

2.3.10. Producción en masa de los hongos entomopatógenos.

2.3.10.1. Generalidades. La presencia natural del hongo entomopatógeno no es suficiente en todos los casos para contener el incremento de la población de insectos que afectan a las plantas cultivadas, por eso, es preciso recurrir a la búsqueda de diferentes estrategias para mejorar el proceso de la

producción a fin de ser usados en la obtención de bioinsecticidas y que estén disponibles para los usuarios en cantidades suficientes, asequibles y de buena calidad, para aprovechar todo el potencial que encierran estos biocontroladores (Resquín, 2016).

Existe un potencial elevado para ser utilizado en el control biológico los hongos del género *Metarhizium* y *Beauveria*, porque éstos pueden ser producidos en masa localmente de manera rentable, y muchas cepas ya están comercialmente disponible. Así, *B. bassiana*, se ha producido en masa sobre diferentes sustratos sólidos, incluyendo los residuos de la caña de azúcar.

La producción del hongo entomopatógeno, se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas o conidios) en un sustrato natural. Se han utilizado y evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente el arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados actualmente. Los métodos de producción incluyen desde la multiplicación artesanal realizada por los productores, la producción semi- industrial a mediana escala hasta la producción industrial a gran escala en las empresas más grandes o compañías, para la cual se requiere de reactivos y equipos más especializados. Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA, 2015).

2.3.10.2. Métodos de producción en masa. Existen varios métodos de producción, los más utilizados a nivel mundial son: la fermentación en estado sólido (FES) y la fermentación difásica (líquida-sólida). (Jaronsky, 2012).

2.3.10.2.1. Fermentación en los sustratos sólidos. Con algunas excepciones es la principal técnica y más practicada en la producción de los hongos Hypocreales, puesto que su estructura erecta permite entrar en contacto con la atmósfera, por ejemplo sobre la superficie de un insecto cadáver. La producción en masa de los conidios aéreos aplicando la fermentación en los sustratos sólidos (Raimbault, 1998) es una aproximación a los procesos naturales y pueden ser eficientes, de baja tecnología y es el método de producción primario en la industria. Además, es el único medio de

adquisición de un producto aéreo purificado estable. La producción, es relativamente rápida en cantidades masivas con un método simple de recuperación (Jaronsky, 2012).

2.3.10.2.2. Fermentación bifásica (líquida-sólida). Desarrollada para el proyecto LUBILOSA (Lutte Biologique contre les Locustes et Sauter-sonux, www.lubilosa.org) para la producción del hongo *Metarhizium flavoviride*. La fase líquida proporciona el micelio de crecimiento activo en las blastósporas en tanto que la sólida provee los conidios aéreos (Lomer *et al.*, 1997).

2.3.10.3. Etapas de la producción en masa. En cualquier método utilizado, las etapas a seguirse son: el aislamiento de las cepas, el cultivo *in vitro* de las cepas; la fermentación líquida (método bifásico); la selección y la preparación del sustrato sólido; luego la inoculación al sustrato sólido e incubación a la temperatura de 20-24°C durante 7-14 días para el crecimiento de los conidios. Posteriormente, la cosecha y el secado del bioproducto a la temperatura de 20 a 25 °C, con una humedad relativa inferior al 40 % por tiempo de 1 a 2 semanas después de la producción; Finalmente, el control de la calidad y almacenamiento. Se pueden conservar hasta seis meses utilizando este método (Jaronsky, 2012).

El proceso de la producción en masa en definitiva va desde el aislamiento de los hongos entomopatógenos hasta la formulación del producto para su aplicación en el biocontrol de insectos plaga. Normalmente, está organizado en tres fases: campo (recolección del hongo), del cepario (cultivos *in vitro* de las cepas fúngicas) y la producción en masa sobre los sustrato sólidos enriquecidos (Bustillos, 2012; Jaronsky, 2012; Merino, 2015).

Trabajos realizados por Pham *et al.* (2010) en la producción de la *B. bassiana* por FES, aprovechando el arroz en bolsas de polietileno (14 días a 25°C), inoculando una concentración de 10^7 esporas/g, consiguieron un rendimiento de 4.05 g de esporas/100 g de sustrato. Otra investigación reciente, es de Taylor *et al.* (2013), obtuvieron 10^8 a 10^9 esporas/g de arroz de *B. bassiana* (citado por Karanja *et al.*, 2016).

2.3.11. Determinación fisiológica de *B. bassiana* y *M. anisopliae* de la producción en masa.

.....**2.3.11.1. Técnicas de control de la calidad microbiológica.** Las principales pruebas que se realizan al bioproducto son: la concentración de los conidios, el porcentaje de la germinación (viabilidad), el crecimiento radial micelial de las colonias y como un ensayo anexo, la pureza (Bustillos, 2012).

Controles que se deben aplicar a todo el proceso de producción del hongo, incluyendo el aislamiento de las cepas, la preparación del inóculo (agentes inoculantes) y en el producto terminado (bioproducto). Un requisito esencial para la producción de cualquier agente de control biológico, es un sistema de control de la calidad efectiva. Entendiéndose por calidad al conjunto de las propiedades y las características de un producto que lo hacen apto para la satisfacción de las necesidades a la cual va dirigida (Fernández & Vega, 2006).

Un producto con especificaciones bien definidas y con los consiguientes procedimientos del control de la calidad certifica su buen funcionamiento y su seguridad, promueve la estandarización de los costes de la producción y garantiza su estabilidad en el mercado lo que conlleva a la ganancia de confianza en el consumidor. En el caso de los hongos y los productos de éstos su funcionamiento no confiable por falta de calidad ha limitado su éxito en países en desarrollo donde estos requerimientos son mínimos o no existen (Elósegui, 2006).

Es por esta razón, se debe implementar no solo un sistema de control de la calidad eficiente para evaluar el producto final, sino también, un sistema del control de la calidad para el proceso, buscando principalmente la obtención de productos con la máxima eficacia en el campo (Castro, 2015).

2.3.12. Pruebas biológicas o bioensayos.

Son los métodos que miden cierta propiedad; en este caso, la patogenicidad, la virulencia y la agresividad de los hongos entomopatógenos en términos de

respuesta biológica (mortalidad) del insecto plaga, para la relación entre el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo.

2.3.12.1. Patogenicidad y virulencia. Se realizan con los organismos vivos, para determinar los siguientes parámetros: el rango de los hospedantes, la virulencia, la competencia ecológica, las condiciones que incrementan o reducen la formación de las epizootias y las barreras de la infección. El desarrollo de un bioensayo requiere del entendimiento del ciclo de vida tanto del patógeno como del hospedante, caso contrario se pueden producir resultados inconsistentes (Ames & Cañedo, 2004). Otros factores que pueden influir en la viabilidad, la virulencia y la eficacia del hongo (conidios) son los métodos de la producción, una formulación adecuada, relacionadas al enriquecimiento del medio o sustratos de cultivo con fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo y, su aplicación (Jaronsky & Jackson, 2012).

Para la ejecución de los bioensayos se deben utilizar los insectos provenientes de crías en el laboratorio, de la misma edad y en buenas condiciones sanitarias. Si se trabaja con larvas o ninfas, éstas deben ser seleccionadas y separadas un día antes de la instalación del ensayo con alimentos libres de contaminación y próximas a mudar, para que lo puedan hacer en el tiempo de espera y no en pleno desarrollo del ensayo. La inoculación de los insectos, se realiza por aspersión o inmersión durante 10 segundos en la suspensión conidial a experimentar mantenidos en incubadora (27°C), se deben observar cada día hasta que muera el 100 % de la población. La mortalidad del tratamiento testigo no debe presentar signos de micosis ni ser superior al 10 % (Ames & Cañedo, 2004).

En los primeros ensayos de la selección, se considera que un aislamiento es altamente patogénico, cuando al término de un tiempo establecido post inoculación de la plaga, un porcentaje igual o mayor al 80% de los insectos inoculados con una suspensión de 1×10^7 conidios/mL, son eliminados. El tiempo varía desde algunos días hasta 15 o más, según la especie del insecto, el sistema de acondicionamiento y la agresividad de la cepa. También, es importante validar los resultados de los bioensayos obtenidos en el laboratorio

a nivel de campo, ya que los presentes factores ambientales, afectan casi siempre la expresión del máximo potencial de los biocontroladores sobre las plagas (Rodríguez, 2009).

Por otro lado, la concentración del hongo entomopatógeno, depende de la susceptibilidad de la plaga, la efectividad del hongo y la calidad del bioproducto obtenido. Por lo tanto, la patogenicidad, la virulencia y la agresividad, se puede determinar con pruebas serológicas y análisis químicos; sin embargo, el resultado definitivo, se obtiene con los bioensayos, es la forma más certera de validar la calidad de un producto con fines de control biológico de insectos (Fernández y Vega, 2006).

Por ello, los resultados de la susceptibilidad, deben estar sustentados en un diseño experimental apropiado, que permita hacer inferencias confiables acerca de la eficacia de una o varias formulaciones comerciales o en proceso de desarrollo. La confiabilidad y las interpretaciones de los resultados, deben partir de un análisis estadístico acorde con el diseño experimental; en este caso del análisis Probit, es la metodología más utilizada en los estudios de evaluación de la susceptibilidad a los insecticidas de origen natural o sintético (Delgado, 2014).

2.3.12.1. Parámetros de evaluación de la susceptibilidad a los bioinsecticidas. Se fundamentan en la relación concentración-respuesta, a través de esta relación, se puede estimar la Dosis Letal Media (DL_{50}); es decir, la dosis que produce un 50 % de mortalidad en la población bajo estudio, es el parámetro más utilizado en la evaluación de la eficacia de un insecticida, cuando ésta evaluación se realiza de forma comparativa. Expresiones equivalentes son: el Tiempo Letal 50 (TL_{50}) y la Concentración Letal 50 (CL_{50}). Es posible estimar estos parámetros, cuando la relación dosis-respuesta (mortalidad) se ajusta a una curva sigmoidea (distribución normal), en la cual las dosis, las concentraciones o los tiempos de exposición, son las variables independientes y el porcentaje de la mortalidad la variable dependiente (Throne *et al.*, 1995).

2.3.12.2. Métodos para la estimación de la concentración letal 50 y tiempo letal 50. Se conocen tres métodos: el gráfico, consiste en dibujar los porcentajes de mortalidad observados en función del logaritmo de las concentraciones aplicadas y se extrapola una línea horizontal y perpendicular entre el eje Y- X, al punto de corte e indica a CL₅₀. El análisis de regresión del Logaritmo (Log) de base 10 de dosis-unidades, que se ajusta a una línea recta (test de Probit). Por último, el cómputo manual con el uso de la calculadora (Delgado, 2014).

La función del análisis de la regresión, se define como: $Y = A + B (\text{Log } X)$ donde: Y= Porcentaje de mortalidad (expresada en unidades Probit); X= Dosis; A = mortalidad cuando log dosis=0 (Intercepto) y B= Pendiente de la recta. Conocidos los valores de A y B, es posible calcular la CL₅₀, al despejar la variable X de la ecuación obtenida: $\text{Log } (X) = (Y - A) \text{ dividido para } B$. Esta expresión es igual al Anti logaritmo de $[(Y - A) / B]$. (Sokal & Rohlf, 1981).

2.3.13. Definiciones básicas en el control microbiano.

Según, Gallegos *et al* (2004), los términos generales más empleados en los bioensayos con los hongos entomopatógenos son los siguientes:

A:

Ambiente: Es el conjunto de elementos abióticos y bióticos que integran la biósfera, sustento y hogar de los seres vivos.

Antagonista: Microorganismo que segrega sustancias capaces de delimitar el crecimiento de otras especies microbianas al desarrollarse en un ambiente dado.

Ana mórficos: Estado asexual de los hongos.

B:

Bioseguridad en el laboratorio: Hace referencia al conjunto de medidas preventivas destinadas a proteger la salud del personal que labora allí. El propósito básico es obtener un ambiente de trabajo seguro y ordenado (Treviño, 2011).

Bioensayo: Son experimentos que se realizan bajo condiciones controladas de laboratorio para evaluar cualitativamente y cuantitativamente el efecto que

los agentes xenobióticos producen sobre organismos vegetales y animales cuidadosamente seleccionados en términos de respuesta biológica

C:

Cinema: Grupo de conidióforos que se unen formando una estructura erecta.

Colonización: Capacidad de un microorganismo para establecerse en todas las partes del interior del cuerpo de un insecto.

Contaminación: Es la presencia en el ambiente de sustancias, elementos, energía o cualquier agente o bien de una combinación de varios agentes en lugares y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud.

Conidio: Espora asexual del hongo, que se separa de la punta de las hifas por constricción.

Conidiógenas: Células especializadas de donde se desarrollan los conidios.

Conidióforos: Hifas especializadas que aporta células conidiógenas (Dulce, 2011).

Control biológico: Uso de organismos vivos (enemigos naturales), introducidos o manipulados, para mantener la población de otro organismo plaga bajo el nivel de daño económico (Sepúlveda, 2012).

Control Microbiano: La utilización de microorganismos (hongos, bacterias, virus, protozoarios y nemátodos) y sus productos útiles para controlar poblaciones de plagas (hongos, bacterias, nematodos, protozoarios, virus, insectos, ácaros, otros).

Cosmopolita: Organismo de distribución mundial.

Cultivo *in vitro*: Es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones u otros organismos y obtener individuos selectos en forma rápida. (Pierik, 1987).

E:

Ectoparásito: Organismo de Desarrollo Superficial externo de un hospedero.

Endoparásito: Organismo que se desarrolla dentro de un hospedero.

Endotoxina: Toxina microbiana que se sintetiza en el interior del microorganismo y permanece dentro de él hasta que éste se autoriza.

Enfermedad epizoótica: Brote de enfermedad en una población animal (insecto) debido a la alta prevalencia de población de microorganismos durante un tiempo y lugar específicos.

D:

Desarrollo micelial: Proceso de la parte vegetativa de los hongos, para la formación de los esporos y fructificaciones.

Desarrollo sostenible: Desarrollo o producción que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades.

DL₅₀: La Dosis Letal 50 se obtiene cuando el efecto que se persigue es la muerte.

E:

Eppendorf: Tubos delgados de polipropileno que transmiten el calor a la prueba de una forma eficiente y homogénea, gracias a la pared lisa y de grosor uniforme.

Enfermedad: Alteración o mal funcionamiento de tejido (s) o cuerpo del hospedante. Dicha alteración lleva al desarrollo de síntomas y es resultado de la irritación continua ocasionada por un agente patogénico o factor ambiental.

Entomófago: Concepto empleado para designar cualquier organismo que se alimenta de insectos o de sus partes.

Entomógeno: Término que se emplea para designar a todo microorganismo que se desarrolla en el cuerpo de un insecto.

Entomopatógeno: Microorganismo que puede causar una enfermedad en un insecto y provocarle la muerte después de un corto periodo de incubación.

Esclerocio: Estructura dura que resiste condiciones desfavorables del medio.

Espora: Unidad reproductiva del hongo.

Esporulación: Después que las hifas atraviesan el integumento, si las condiciones son de alta humedad relativa, en un periodo de 24 a 48 horas ocurre la producción de esporas o conidias (FUNICA, 2015).

F:

Fito patógeno: Término que se aplica a los microorganismos que producen enfermedades en las plantas.

H:

Hemocele: Senos o espacios del cuerpo no revestidos de peritoneo y llenos de sangre característicos de muchos invertebrados.

Hialino: Transparente, incoloro.

Hifa: Una estructura filamentosa y tubular, que constituye la célula individual fúngica. Las hifas se desarrollan en red formando su conjunto el micelio.

Himenio: Hifas especializadas para la producción de esporas.

Hongo: Organismos halofítico que carece de clorofila y que tiene estructura filamentosa.

Hospedero: Término empleado para designar al organismos que alberga a otro en su interior.

I:

Infección: Introducción de una o más especies de microorganismos al cuerpo de un hospedero susceptible, lo cual no significa necesariamente una enfermedad o síntoma.

M:

Micelio: Conjunto o masa de hifas que constituyen el soma de un hongo.

Micosis: Infección provocada por hongos.

P:

Patógeno: Son microorganismos capaces de producir enfermedad en hospederos susceptibles bajo condiciones normales.

Plaguicidas de uso agrícola: "Es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio y que interfieren de cualquier otra forma en la producción.

R:

Riesgo: Cualquier condición, proceso o suceso que puede ocasionar daños en la salud, seguridad o en las propiedades de los habitantes de una región.

S:

Saprophyto: Especie microbiana que se desarrolla en materia orgánica en descomposición, como medio propicio, sin afectar otras especies.

V:

Virulencia: Capacidad de un microorganismo para provocar infección, generar enfermedad y distribuirse en una población susceptible. Se emplea para designar grados de intensidad y rapidez con que un patógeno causa una enfermedad, se distribuye y mata a su hospedero.

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Ubicación geográfica y climática del experimento.

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo, en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica y el Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad Estatal de Bolívar, localizada en la provincia de Bolívar, cantón Guaranda, parroquia Guanujo, Laguacoto II (ver Cuadro 12).

Cuadra 12. Ubicación geográficamente y climática.

Altitud	2668 msnm
Longitud:	79° 00' 02" O
Latitud:	01° 34' 15" S
Temperatura máxima:	18°C
Temperatura mínima:	8°C
Temperatura media anual:	13°C
Humedad Relativa:	60%
Precipitación media anual:	687 mm

Fuente. Estación Meteorológica Laguacoto II (2015).

3.2. Tipo y diseño de la investigación.

3.2.1. Tipo de investigación.

Por el tipo de investigación fue: la aplicada, ya que se persiguió un fin específico, como el aislamiento de las cepas nativas de *B. Bassiana* y *M. anisopliae* para la producción de conidios y la determinación de la virulencia sobre los insectos plaga *H. hampei* y *M. andigena* en el laboratorio.

Por la temporalidad: La longitudinal, efectivamente se recolectaron los datos a través del tiempo en períodos determinados para realizar los ensayos.

Por el tipo de enfoque: El cuantitativo y un alcance descriptivo correlacional, ya que se recolectaron datos de los factores físicos, químicos, microbiológicos y biológicos para la verificación de las hipótesis con base al análisis estadístico e inferencial.

Por el diseño de investigación: El experimental, pues se manipularon las variables independientes.

3.2.2. Diseño de la investigación.

El diseño aplicado fue el Multi Factor Categórico; se valoraron las variables cuantitativas aplicando el Análisis de Varianza (ANOVA), la comparación múltiple de medias, el contraste múltiple de rangos de la diferencia significativa mínima (LDS) de Fisher y los bioensayos con Probit. Un $P \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Se utilizaron 40 tratamientos y 3 repeticiones para la determinación de la variable producción en masa de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre gramos de sustrato en el laboratorio (ver Cuadro 13).

Cuadro 13. Promedios de la producción en masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (1×10^7 conidios/g).

N° Tratamientos	Códigos	Descripción del tratamiento
1	A1 ¹ B1C1D1	Arroz, ² agua destilada estéril, ³ concentración 1, <i>B. bassiana</i>
2	A1B1C1D2	Arroz, agua destilada estéril, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
3	A1B1C2D1	Arroz, agua destilada estéril, ⁴ concentración 2 <i>B. bassiana</i>
4	A1B1C2D2	Arroz, agua destilada estéril, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
5	A1B2C1D1	Arroz, harina de amaranto, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
6	A1B2C1D2	Arroz, harina de amaranto, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
7	A1B2C2D1	Arroz, harina de amaranto, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
8	A1B2C2D2	Arroz, harina de amaranto, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
9	A1B3C1D1	Arroz, harina de soya, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
10	A1B3C1D2	Arroz, harina de soya, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
11	A1B3C2D1	Arroz, harina de soya, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
12	A1B3C2D2	Arroz, harina de soya, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
13	A1B4C1D1	Arroz, leche en polvo, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
14	A1B4C1D2	Arroz, leche en polvo, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
15	A1B4C2D1	Arroz, leche en polvo, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
16	A1B4C2D2	Arroz, leche en polvo, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
17	A1B5C1D1	Arroz, levadura, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
18	A1B5C1D2	Arroz, levadura, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
19	A1B5C2D1	Arroz, levadura, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
20	A1B5C2D2	Arroz, levadura, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
21	A2B1C1D1	Maíz, agua destilada estéril, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
22	A2B1C1D2	Maíz, agua destilada estéril, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
23	A2B1C2D1	Maíz, agua destilada estéril, concentración 2 <i>B. bassiana</i>
24	A2B1C2D2	Maíz, agua destilada estéril, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
25	A2B2C1D1	Maíz, harina de amaranto, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
26	A2B2C1D2	Maíz, harina de amaranto, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
27	A2B2C2D1	Maíz, harina de amaranto, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
28	A2B2C2D2	Maíz, harina de amaranto, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
29	A2B3C1D1	Maíz, harina de soya, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
30	A2B3C1D2	Maíz, harina de soya, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
31	A2B3C2D1	Maíz, harina de soya, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
32	A2B3C2D2	Maíz, harina de soya, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
33	A2B4C1D1	Maíz, leche en polvo, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
34	A2B4C1D2	Maíz, leche en polvo, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
35	A2B4C2D1	Maíz, leche en polvo, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
36	A2B4C2D2	Maíz, leche en polvo, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>
37	A2B5C1D1	Maíz, levadura, concentración 1, <i>B. bassiana</i>
38	A2B5C1D2	Maíz, levadura, concentración 1, <i>M. anisopliae</i>
39	A2B5C2D1	Maíz, levadura, concentración 2, <i>B. bassiana</i>
40	A2B5C2D2	Maíz, levadura, concentración 2, <i>M. anisopliae</i>

¹ Suplemento nutritivo (SN) = B. Melaza (MZ), Harina de amaranto (HA), Harina de soya (HS), Leche en polvo (LP) y Levadura (LV) ² Agua destilada estéril (ADE) ³. Concentración 1 (Melaza 2,5 g y SS 0,25 g) ⁴, Concentración 2 (Melaza 5,0 g y SS 0,50 g). Fuente: **Merino (2015)**.

3.3. Unidad de análisis.

La unidad de análisis fue 100 g de sustrato sólido nutritivo (sustrato más suplemento), precocidos y estériles con el agente inoculante *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* nativos, contenidas en una funda de polipropileno de alta densidad, de tamaño de 25 × 30 centímetros (cm).

3.4. Población de estudio.

La población en estudio fueron los hongos entomopatógenos nativos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*; Además, los insectos plaga *Hypothenemus hampei. Ferrari* y *Mahanarva andigena. Jacobi*.

3.5. Tamaño de la muestra.

La muestra en estudio para la producción en masa de la *B. bassiana* y el *M. anisopliae* fue 1 mL de la suspensión fúngica de concentración 1×10^7 conidios/mL, inoculada a los 100 g de sustratos nutritivos estériles, distribuidos en cada uno de tratamientos y repeticiones. En los bioensayos, el tamaño de la muestra fue 10 insectos de la broca del café (*Hypothenemus hampei. Ferrari*) y 10 ninfas del tercer instar de salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena. Jacobi*) con cinco réplicas por el lapso de 10 días que duró la experimentación.

3.6. Selección de la muestra.

Se eligieron las cepas nativas aisladas de *la B. bassiana* y el *M. anisopliae* conservadas en una solución de glicerol estéril al 15 % de concentración, contenidas en los tubos Eppendorf de 2,5 mL y almacenadas en ultra congelación a la temperatura de -84 °C, para ser inoculadas a los sustratos nutritivos para la producción en masa de los hongos.

3.7. Materiales.

3.7.1. Materiales de laboratorio.

Los equipos, instrumentos, materiales, medios de cultivos, reactivos, consumibles e insumos (ver Cuadro 14).

3.7.2. Material fúngico.

Las cepas nativas aisladas del género *Beauveria* y *Metarhizium*. Además, los insectos plaga de la broca del fruto de café (*Hypothenemus hampei*. Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi), recolectadas en el campo.

Cuadro 14. Equipos, instrumentos, materiales, medios de cultivo, reactivos, consumibles e insumos.

Equipos	Agitador Vortex. V1. Plus BOECO	Balanza digital. MEMMERT Toledo IKAM C-MAGHS7	Colony Counter CC-1. BOECO	Microscopio óptico. MEIJO TECHNO	Potenciómetro. HANNA Instruments HI 3220	Refrigerador ECASA
	Autoclave vertical. WiseClave WAC-60	Cámara de flujo laminar. Labconco TM	Incubadora Esterilizador MEMMERT	Destilador de agua. BOECO	Estufas MEMMERT	Ultra Refrigerador (-85°C). WiseCryo
	Plancha de calentamiento y Agitador magnético.	Laptop e impresora. Cámara digital	Horno microondas. BOECO	Cámara Neubauer improved. MARIENFELD	Material de vidrio, porcelana y plástico.	Titulador automático. BOECO
Instrumentos	Asas de platino. Tubos Eppendorf	Pipetas automáticas. BOECO	Micro Pipetas. BOECO	Placas y cubre objetos	PC. Sony. Monitor. Software Lino lite	Mechero Bunsen. Calibrador Vernier
	Agujas metálicas D40	Puntas de pipetas plásticas	Tijeras y estiletes	Selladora eléctrica de bolsas	Sacabocado de cobre	Tubos bacteriológicos y Falcón
	Gradillas autoclavables	Algodón, gasa, hilo plástico	Cotonetes, cintas PetriFilm®	Jeringas desechables	Paletas de madera	Mandil, mascarilla, cofias
	Guantes de goma	Papel de aluminio y filtro	Cinta adhesiva y mascarillas desechables	Marcadores permanentes	Hojas de registro	Regla, esferográficos y lapiceros
Materiales, Medios de Cultivo. Reactivos. Insumos	Alcohol antiséptico 75%	Alcohol industrial 90%	Glicerol al 15%. Xilol, cetona	Azul de lactofenol, ácido láctico, Aceite de inmersión	Tween-80. cloranfenicol de 500 mg	Acido clorhídrico e hidróxido de sodio 0.1 N
	Hipoclorito de sodio 0,5%	Jabón líquido. Paños húmedos	Fundas de polipropileno paquetes 100 unid	Papel higiénico y Toallas desechables	Grapadora, perforadora	Botas de caucho, chompa impermeable
	Medio de cultivo: PDA, SDA, Peptona. DIFCO	Extracto de levadura. Agar-Agar. DIFCO	Sustratos sólidos: Arroz y maíz	Sustratos nutritivos: Melaza	Sustratos nutritivos: Harina de amaranto y soya	Sustratos nutritivos: Leche en polvo y levadura

Fuente. Laboratorio Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica (2015).

3.8. Técnicas de recolección de datos.

La información, se obtuvo del aislamiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, los cultivo *in vitro*, la determinación morfo-fisiológica y biológica; la medición de conidios, el control de calidad de los aislados, la producción en masa, los

bioensayos de la patogenicidad y la virulencia, la determinación de la concentración y tiempo letal 50 (CL₅₀ y TL₅₀).

La presente investigación, se desarrolló en dos fases: la de campo y de laboratorio.

3.8.1. Fase de campo.

3.8.1.1. Bioprospección de las fincas en estudio. La bioprospección, se realizó en las fincas productoras de café y caña de azúcar de cuatro parroquias rurales en el Ecuador. Las visitas de campo, se realizaron a partir de enero de 2015, se monitorearon las propiedades cada 15 días. Para la toma de las muestras, se midió una hectárea del cultivo, se templó un hilo plástico en línea diagonal y se eligieron seis puntos de muestreo. En cada punto, se observaron detenidamente tres plantas empezando por la parte inferior de las vainas foliares y el cogollo del tallo, a fin de distinguir la presencia de las ninfas o adultos de *Mahanarva andigena*. Jacobi micosados por el hongo *Metarhizium spp.* (Estrada et al. 2004).

La misma metodología, se utilizó para la bioprospección de la *Beauveria sp.*, pero a diferencia del muestreo anterior los entomopatógenos se recolectaron desde el fruto del café (*Coffea arabica L.*) infestado por el hongo entomopatógeno.

La bioprospección y georreferenciación de cepas nativas de los hongos entomopatógenos del género *Beauveria* y *Metarhizium* (ver Cuadro 15).

Cuadro 15. Bioprospección y georreferenciación de las cepas del género *Beauveria* y *Metarhizium* nativas.

Código Cepas nativas	Origen	Hospedero	Geo referencia (Latitud y Longitud)	Altitud (msnm)
COMPBb01	Ángeles- Ventanas-Los Ríos	<i>H. hampei</i> en el fruto del café	-1.062681 -77.790164 01°23'29.00"S 9°22'21.00"W	300
COMPBb02	Apuya-Tena- Napo	<i>H. hampei</i> en el fruto del café	-1.104860 -77.790164 1°06'17.50"S 77°47'25.14"W	525
COMPBb03	Cena- Echeandía- Bolívar	<i>H. hampei</i> en el fruto del café	-1.062681 -77.790164 1°03'45.90"S 77°47'25.14"W	540
COMPMa01	Ángeles- Ventanas-Los Ríos	<i>M. andigena</i> en el salivazo de la caña de azúcar	-1.062698 -77.790171 01°23'29.08"S 9°22'21.20"W	296
COMPMa02	Teniente Hugo Ortiz-Puyo- Pastaza	<i>M. andigena</i> en el salivazo de la caña de azúcar	-1.364687 -77.954567 1°21'52.94"S 7°57'16.68"W	1070
COMPMa03	Cena, Echeandía- Bolívar	<i>M. andigena</i> en el salivazo de la caña de azúcar	-1.357509 -77.792451 1°21'27.203"S 79°47'32.82"W	189

3.8.1.2. Recolección de los especímenes en el campo. Se recolectaron de tres fincas productoras de café el hongo entomopatógeno del género *Bassiana*, codificadas como COMPBb01, COMPBb02 y COMPBb03, en cada punto de muestreo en tarrinas plásticas desinfectadas, la cantidad de un kilogramo (Kg) de fruto del café infestados por el hongo. Los hongos del *Metarhizium* sp., asignados con los códigos: COMPMa01, COMPMa02 y COMPMa03, se colectaron desde los cadáveres micosados (verde oliva) del insecto salivazo de caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi) en 10 viales de vidrio estériles de capacidad de 10 mL.

El material biológico codificado, se transportó en una nevera de poli estireno con refrigerante ($16 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura) hasta el laboratorio de microbiología para su análisis.

3.8.2. Fase de laboratorio.

3.8.2.1. Desinfección superficial de los especímenes. Se efectuó por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % durante 3 minutos a los insectos salivazos (*M. andigena*) infestados con *Metarhizium sp.*, y por 5 minutos a los frutos del café micosados por el hongo del género *Beauveria*. Se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril (ADE), para la eliminación del exceso de humedad se colocaron los especímenes sobre papel filtro estéril. Se prepararon cámaras húmedas con papel filtro estéril y se ubicaron a cada uno sobre dos portaobjetos en cruz en el interior de las cajas de Petri (100 x 15 milímetros). Luego, se incubaron en incubadora (Memmert) a 27°C de temperatura durante 7 días para inducir el crecimiento del micelio (Cañedo & Ames, 2004; García *et al.*, 2012).

.....**3.8.2.2. Siembra del hongo del género *Beauveria* y *Metarhizium*.** En la cámara de flujo laminar, se sembró el micelio con aguja microbiológica, mediante la técnica de punción central, se toca ligeramente el cuerpo del espécimen donde existe crecimiento fungoso y se transfiere su contenido a medio de cultivo fijo Dextrosa Agar Sabouraud-DIFCO^{MR} (SDA) para la *Beauveria spp.*, y en medio Papa Dextrosa Agar-DIFCO^{MR} modificada el *Metarhizium spp.* Se sellan los bordes de las cajas de Petri con tiras Parafilm[®] y se incuban a 27°C durante 7 días hasta el crecimiento de las colonias blanco algodonosas, característico de estos hongos (Humber, 2012). Centro Internacional de la caña de Azúcar (CENICAÑA, 2011); García *et al.* 2012).

3.8.2.3. Cultivos monospóricos, preparación de la suspensión y siembra. Para la obtención del cultivo monospórico (puro), se utiliza el método que sigue: se prepara la suspensión fúngica, aislando directamente del insecto o fruto del café desinfectado, en un tubo bacteriológico con medio de

cultivo SDA y PDA modificado (inclinados), se incuban a 27°C durante 5 días (Ames & Cañedo, 2014; Ayala *et al.* 2012).

3.8.2.3.1. Preparación de la suspensión fúngica. Se usa el método de la dilución hasta obtener una concentración de 1×10^3 conidios/mL, se parte de los hongos cultivados en los tubos inclinados, se usa un tubo Eppendorf con 1 mililitro (mL) de la solución Tween-80 al 0.1% estéril (a 121 °C, 15 Libras/Kg² de presión por 20 minutos), se coloca una pequeña fracción del hongo, se agita en un Vortex por 15 segundos para separar los conidios. Se carga 10 microlitros (μL) de la suspensión preparada en la cámara Neubauer Improved Bright-Line (Boeco), se cuenta el número de conidios bajo el microscopio óptico (MIDCIS) con el lente objetivo 40X y se realizan los cálculos.

3.8.2.4. Determinación morfológica de los hongos del género *Beauveria* y *Metarhizium*. Esta determinación se basa en la descripción macroscópica de la colonia y la microscópica de las estructuras del hongo; es la primera fase que se realiza para una correcta identificación de la especie que se está ensayando.

3.8.2.4.1. Descripción de la colonia: Con una aguja microbiológica, se pasa levemente el hongo a propagar y se siembra por punción en ángulo de 90° en el centro de la placa conteniendo el medio de cultivo PDA modificado con cloranfenicol (500 g/Lt). Se incuban a 27°C durante 15 días. Se observa la forma de crecimiento de la colonia, aspecto, textura y coloración de ambas caras de la placa de Petri para distinguir la producción del pigmento.

3.8.2.4.2. Descripción del hongo: Se toma con el asa estéril una pequeña muestra del tejido hifal del cultivo de 5 días y se hace una impronta, rozando levemente la superficie de una colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente, se fija sobre una lámina portaobjetos y se observa al microscopio con el lente de 40X. Las formas, se capturan con el microscopio óptico MEIJO TECHNO y se utiliza el software Dino Lite (Técnica del

Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica, 2015). (Ames & Cañedo, 2004).

3.8.2.5. Identificación de la *B. bassiana* y el *M. anisopliae* nativos.

Para su identificación se puede utilizar entre otras técnicas, la caracterización morfo-fisiológicas, biológicas y las claves taxonómicas de (Rehner *et al.* 2011; Domsch *et al.* 2007; Brady, 1979; Hoog, 2000); compendios, que facilitan la diferenciación de las características macro y microscópicas, tanto de las colonias como de las estructuras reproductivas de los hongos aislados, las mismas que ayudaron a la identificación de las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

3.8.2.6. Conservación de las cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Las cepas puras, se conservan en una solución estéril de glicerol al 10% en tubos Eppendorf de 2,5 mL, debidamente codificados. La técnica, consiste en el vertido aséptico de 1 mL de esta solución en los tubos y sobre ésta con la ayuda de un asa estéril se coloca cinco discos de 5 mm de diámetro del hongo cultivado, se tapan y sellan los tubos con tiras de Parafilm y finalmente, se introducen en el ultra congelador a la temperatura de - 84° C, con el fin de que perdure la viabilidad y la virulencia de los hongos entomopatógenos por un tiempo aproximado de 5 años.

3.8.2.7. Técnicas de control de la calidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

3.8.2.7.1. Prueba de la pureza. Para su determinación, se realiza el siguiente procedimiento: Se prepararon 150 mL del medio atemperado de SDA con 1 mL de agregado de antibiótico de concentración 0,016 % (0,25 g de cloranfenicol en 100 mL de ADE). Luego se toma 50 µL de la dilución 1×10^3 conidios/mL de cada sub muestras del patrón, previo al homogenizado en el Vortex por un minuto, se inocula 0,1 mL en la superficie de cinco cajas con el medio fijado, se dispersa asépticamente con la espátula de Digrafsky. Luego, se incuban a 27°C de temperatura y cada 24 horas se contabilizaran las colonias durante 7 días. El recuento, se expresan en unidades formadoras de

colonias (UFC). Técnica modificada de Bustillo, 2006. El porcentaje de pureza (P), se calcula con la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de pureza (\%)} = \frac{\text{UFC del hongo evaluado}}{\text{UFC totales}} \times 100$$

3.8.2.7.2. Concentración de la producción in vitro. Se toma asépticamente cinco discos de 5mm de diámetro del cultivo monospórico de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se suspenden en la solución Tween-80 al 0.1%, a partir de esta suspensión patrón se preparan las diluciones decimales desde 1×10^1 conidios/mL hasta 1×10^6 conidios/mL. Se utiliza la concentración 1×10^3 conidios/mL, se carga la cámara de Neubauer con 10 μ L, se deja en reposo por un minuto y se cuenta los conidios en cuatro cuadrantes de la cámara en el microscopio con el objetivo de 40X. El número de conidios se calcula, determinando el promedio y multiplicando por 16, 25, 10^4 , 10 y el factor de dilución (FD). La fórmula para su estimación es la siguiente:

$$\text{Nº conidios/mL} = \text{Promedios de conidios} \times 400 \times 10^5 \times FD$$

3.8.2.8. Producción en masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos.

La producción, se fundamenta en la propagación de micelios y sus estructuras reproductivas (esporas o conidias) en un sustrato sólido natural principalmente en granos de cereales o leguminosas; al presente los más utilizados son el arroz, avena, cebada, trigo e incluso bagazo de la caña de azúcar (Jaronski, 2012).

3.8.2.8.1. Preparación del sustrato. Se lavan los sustratos de arroz y maíz (por separado) tres veces con abundante agua, se preoce por espacio de 5 minutos al arroz y por 10 al maíz, se tamiza en frío. Luego, se formula los sustratos sólidos con los suplementos nutritivos a la concentración 1 y 2 (2,5 y 5.0 g de melaza + 0.25 y 5,0 g añadidos proteicos), respectivamente. Se pesa 100 g de cada formulado en bolsas de polipropileno de alta densidad

de 25× 30 centímetros (cm), se sellan con grapas haciendo tres dobleces en la parte superior de las bolsas y se esterilizan a 121°C de temperatura, 15 lb/Kg² de presión, durante 20 minutos, se enfría completamente de 3 a 4 horas para ser inoculadas.

3.8.2.8.2. Ajuste de la concentración del inoculante. Se toma un cultivo de una caja de Petri llena de las cepas monospóricas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a continuación, se restriega con el rastrillo estéril, se introduce en un tubo bacteriológico y se suspende en solución estéril Tween-80 al 0,1% de concentración. A partir de ésta solución patrón se prepara 3 diluciones de base 10, añadiendo asépticamente 1 mL con pipeta estéril al segundo, tercero y se obtiene la concentración 1×10^3 conidios/mL. De ésta suspensión se toma 10 µL, se carga la cámara Neubauer y se realiza el conteo de los conidios. Con el valor obtenido, se ajusta la concentración del inóculo a 1×10^7 conidios/mL, aplicando la fórmula siguiente.

$$[\text{Conidios}]/\text{mL} = \frac{\text{Volúmen sol. patrón (mL)} \times \text{Concentración sol. patrón}}{1 \times 10^7 \text{ conidios/mL}} \times 100$$

3.8.2.8.3. Fermentación sólida para la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. El método que se utilizó para la producción en masa de los hongos ensayados, fue la fermentación en estado sólido (FES). Los inóculos (conidios) de cada aislamiento se produjeron en los sustratos sólidos nutritivos de arroz y maíz (troceado), en el laboratorio.

La técnica es como sigue; en la cámara de flujo laminar, se toma 1 mL con una jeringa estéril de 5 mL la suspensión fúngica de concentración 1×10^7 conidios/mL (Jaronsky, 2012) y se inocula a cada una las bolsas formuladas estériles. Se cubre el agujero de la funda con cinta adhesiva. Se homogenizan las fundas inoculadas con movimientos leves para que haya un crecimiento y desarrollo uniforme del hongo *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Las fundas se incuban a una temperatura de 27°C de 15 a 20 días, hasta esporulación completa.

3.8.2.8.4. Secado y mantenimiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas. Transcurrido los 20 días de incubación, se secan los conidios (para el mantenimiento elevado de la viabilidad) a la temperatura de 20 a 25°C, una humedad relativa (HR) < 40 % durante el lapso de 3 a 5 días; se emplean, especialmente bolsas de papel kraft (confeccionadas en forma horizontal). Luego, se pasa por un tamiz rotatorio (apertura de poro 180 mesh), se empacan en bolsas de aluminio, se sellan y se guarda en la refrigeración a 4 °C. Estos bioproductos, conservados de este modo pueden permanecer sin mayores alteraciones por seis meses; no obstante, es indispensable monitorear periódicamente, la concentración de los conidios y la viabilidad, antes de ser utilizados (Jaronsky & Jackson, 2012; Fanti & Alves, 2013).

Finalmente, cabe mencionar que el bioproducto obtenido en el laboratorio, se utiliza para la preparación de las suspensiones de conidios y la inoculación de los insectos plaga de café y caña de azúcar (*H. hampei* y *M. andigena*) respectivamente, para la determinación de la patogenicidad y virulencia de la *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas a través de la ejecución de los bioensayos.

3.8.2.9. Determinación fisiológica de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el producto terminado (bioproducto). Las técnicas de control de la calidad microbiológica del bioproducto, se realiza a través de la evaluación del rendimiento en número de conidios por gramo, el porcentaje de la germinación (viabilidad) y la pureza de cada lote (Marín *et al.* 1997; Castro, 2015).

3.8.2.9.1. Determinación de la concentración de conidios. Se basa en la evaluación del número de unidades infectivas (conidios) por unidad de peso o volumen que existe en un formulado y es útil para establecer la dosificación de la *B. bassiana* y el *M. anisopliae*. Estos controles, se efectúan con las cepas que resultan ser las más promisorias, como la (COMPBb01 y COMPMa01). Se utilizó el método descrito por Marín *et al.* 1997; Castro, 2015; Gálvez *et al.*, 2015).

Detalle del método: se toma al azar una funda del lote de un cultivo de 15 días de crecimiento, se pesa 10 g de cultivo y se diluye en 100 mL en solución Tween-80 al 0.1% estéril, se obtiene la solución patrón (10^0). De ésta, se toma asépticamente 10 mL y se disuelve en 9 mL de la misma solución Tween-80, se tiene la dilución 10^1 y así sucesivamente hasta obtener una dilución 10^3 , de la cual se mide 2 alícuotas de 10 μ L y se llena en los dos cuadrantes de la cámara de Neubauer. Para el cálculo del número de conidios (ver fórmula de acápite 3.8.2.7.2). De esta forma se determina la concentración de conidios de la *B. bassiana* y el *M. anisopliae* por gramo de sustrato nutritivo.

3.8.2.9.2. Determinación de la viabilidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Esta determinación, se realiza como un indicador de la capacidad y velocidad del conidio de emitir el tubo germinativo *in vivo* para poder penetrar potencialmente la cutícula del insecto (Castro, 2015). Se evaluó la capacidad germinativa de las cepas expresada en porcentaje (Gálvez *et al*, 2015).

Esta técnica consiste en inocular alícuotas de 5 μ L en cajas de Petri con 15 mL de agar-agar sin acidificar; se marca en el envés de las cajas cinco círculos para delimitar el espacio donde se depositaran las alícuotas de la concentración 1×10^3 conidios/mL. Luego, se incuban a la temperatura de 27°C por 24 Horas. Transcurrido este tiempo, se adiciona una gota de azul de lacto fenol para detener el proceso de la germinación. Los puntos de la inoculación cultivados, se cortan en cuadrados con un bisturí estéril, se transfieren a laminas portaobjetos y se cubre con una laminilla para observar al microscopio con la lente 40X los conidios viables y se determina la germinación en cinco campos microscópicos por alícuota. Luego, se totaliza los conidios germinados y no germinados. Para cada cepa, se utiliza cinco cajas de Petri por repetición. Con los datos obtenidos, se aplica la fórmula (N° de conidios germinados/ N° de conidios totales por 100) y se determinan los porcentajes de la germinación (Gerónimo-Torres *et al.*, 2016).

3.8.2.9.3. Determinación de la pureza para la producción en masa. Esta prueba se fundamenta en la determinación de la proporción del agente biológico en la formulación y la identificación de los microorganismos

contaminantes, contribuyendo a mejorar el proceso de la producción y la formulación de los hongos entomopatógenos. Los lotes deberán estar libres de todo tipo de contaminaciones (Marín *et al.* 1997).

La técnica, se describe así: se siembra una alícuota obtenida a partir de una dilución seriada de cada lote; se prepara en placas de Petri con el medio de cultivo PDA modificado estéril (se vierte aproximadamente 16 mL), se inocula cada placa y se incuba a una temperatura de 27 °C, durante 7 días con el fin de promover el desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC); después del período de incubación se identifica cada uno de los microorganismos presentes como son las colonias del hongo entomopatógeno evaluado, otros hongos, bacterias y levaduras encontrados. El porcentaje de pureza (P) se calcula de la siguiente manera: $P (\%) = \frac{\text{UFC del hongo evaluado}}{\text{UFC totales}} \times 100$.

Se considera que las formulaciones comerciales deben poseer un porcentaje de pureza superior al 90%. Los microorganismos contaminantes permisibles, no deben causar daño a la salud humana, animal, vegetal ni al ambiente (Marín *et al.* 1997).

3.8.2.10. Bioensayo de la patogenicidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos en el laboratorio. Se analiza la patogenicidad de los hongos aislados y se determina la mortalidad de *H. hampei* y *M. andigena* producida por los tres aislamientos de *B. bassiana* y los tres de *M. anisopliae*. Los bioensayos se realizan sobre 10 insectos adultos de diez días de nacidos, no sexuados de *H. hampei* y 10 ninfas del salivazo de la caña de azúcar *M. andigena* del tercer instar a nivel de laboratorio.

La técnica se describe a continuación: se sumergen a los adultos de la broca *H. hampei* en una suspensión de 1×10^7 conidios/mL de *B. bassiana* durante 1 minuto y las ninfas *M. andigena* por 15 segundos en una suspensión de *M. anisopliae* de la misma concentración. Se evalúan frente a dos testigos conteniendo una solución Tween-80 (0,1%) sin el hongo. Se realizan cinco réplicas de cada aislamiento con 10 adultos y 10 ninfas con sus respectivos

testigos (la mortalidad no debe superar el 10%). Se registra el número de insectos y ninfas muertas cada 24 horas durante 10 días. Se confirma la infección fúngica, colocando a los especímenes muertos en cámaras húmedas, incubando a la temperatura de 27 °C durante 3 días. Los porcentajes de la mortalidad, se calculan para cada aislamiento, únicamente se consideran los especímenes muertos por infección fúngica confirmada (micosados); se realiza un promedio entre las cinco réplicas y se corrige la mortalidad con la fórmula de Abbott.

3.8.2.11. Bioensayo de la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas en el laboratorio. Para, la ejecución de esta prueba, se utilizan los aislamientos que presentan los porcentajes de mortalidad elevados en el bioensayo de la patogenicidad. Para la determinación de la virulencia, se evalúa el porcentaje de mortalidad, la concentración letal 50 (CL₅₀) y el tiempo letal 50 (TL₅₀) de la *B. bassiana* y el *M. anisopliae* sobre los insectos brocas del café *H. hampei* y las ninfas de la caña de azúcar *M. andigena* a nivel del laboratorio.

La técnica es como sigue: se prepara seis suspensiones de conidios de cada aislamiento y se evalúan las concentraciones 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios/mL. Luego, por cada aislamiento se sumergen los insectos en las distintas suspensiones siguiendo el protocolo expuesto en el ensayo de la patogenicidad. Se efectúan cinco réplicas con 10 insectos por cada aislamiento y concentración, y un testigo con Tween-80 (0,1%) sin conidios. Se registra el número de insectos muertos cada 24 horas durante 10 días. Los insectos muertos se recogen y se colocan en cámaras húmedas a 27°C durante tres días para confirmar la muerte por la infección fúngica.

Los datos obtenidos, se analizan con la prueba de Probit, utilizando el software Statgraphics Plus®, versión 5.1 (Velásquez, 2016) y R 386, versión 3.3.2. A partir de estos bioensayos se determinan los aislamientos más virulentos sobre la broca de café (*Hypothenemus hampei*. Ferrari) y salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi) por las cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, respectivamente.

3.9. Variables.

3.9.1. Variable independiente.

Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin.

3.9.2. Variables dependientes.

Las características morfo fisiológicas de las colonias de la *B. bassiana* y el *M. anisopliae*.

Números de conidos por mililitros y gramos.

Porcentajes de la pureza de *B. bassiana* y *M. anisopliae* *in vitro* y en masa.

Porcentajes de la germinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Porcentaje de la mortalidad de *H. hampei* y *M. andigena*.

Concentración letal 50 de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la *H. hampei* y *M. andigena*.

Tiempo letal 50 de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la *H. hampei* y *M. andigena*.

3.9.3. Variables intervinientes.

Aislamiento de las cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Temperatura y tiempo de incubación.

Humedad relativa.

Esporulación.

Sustratos sólidos (arroz y maíz).

Suplementos nutritivos (como fuentes de carbono y nitrógeno).

Patogenicidad y virulencia.

La matriz de consistencia de la presente investigación (ver Anexos).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados.

4.1.1. Determinación morfológica de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas.

4.1.1.1. Aislamiento de los hongos entomopatógenos nativos. Se aislaron seis cepas, tres de *Beauveria* sp., y tres de *Metarhizium* sp., colectados en las fincas productoras de café y caña de azúcar de cuatro parroquias subtropicales en el Ecuador; previamente desinfectadas, se cultivaron en el medio fijo Sabouraud Dextrosa Agar y Papa Dextrosa Agar modificada (ver Figura 7).



Figura 7. Colonias aisladas del género *Beauveria* (A) y *Metarhizium* nativas en los medios de cultivos SDA y PDA modificada (B). Fuente. Merino, 2016.

El grado de infestación del fruto de café y los cadáveres del salivazo por las cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en su hábitat natural fue notorio,

lo que permitió la obtención de aislados monospóricos (puros). Estos resultados coinciden con los expresados por Jaronski (2012), en relación a la existencia en forma natural de estos hongos entomopatógenos en el campo, posibilitando la colección y aislamiento de cepas nativas a partir de los prototipos elegidos para este estudio de forma constante.

4.1.1.2. Descripción macroscópica de las colonias de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Se fundamentó, en el análisis de las características macroscópicas de las colonias puras que se obtuvieron del cultivo monospórico. Se evaluaron: la forma de crecimiento de la colonia, el aspecto, la textura, la coloración del medio de cultivo en ambas caras de la caja de Petri (haz y envés), la producción y difusión de los pigmentos en el cultivo (ver Figura 8).

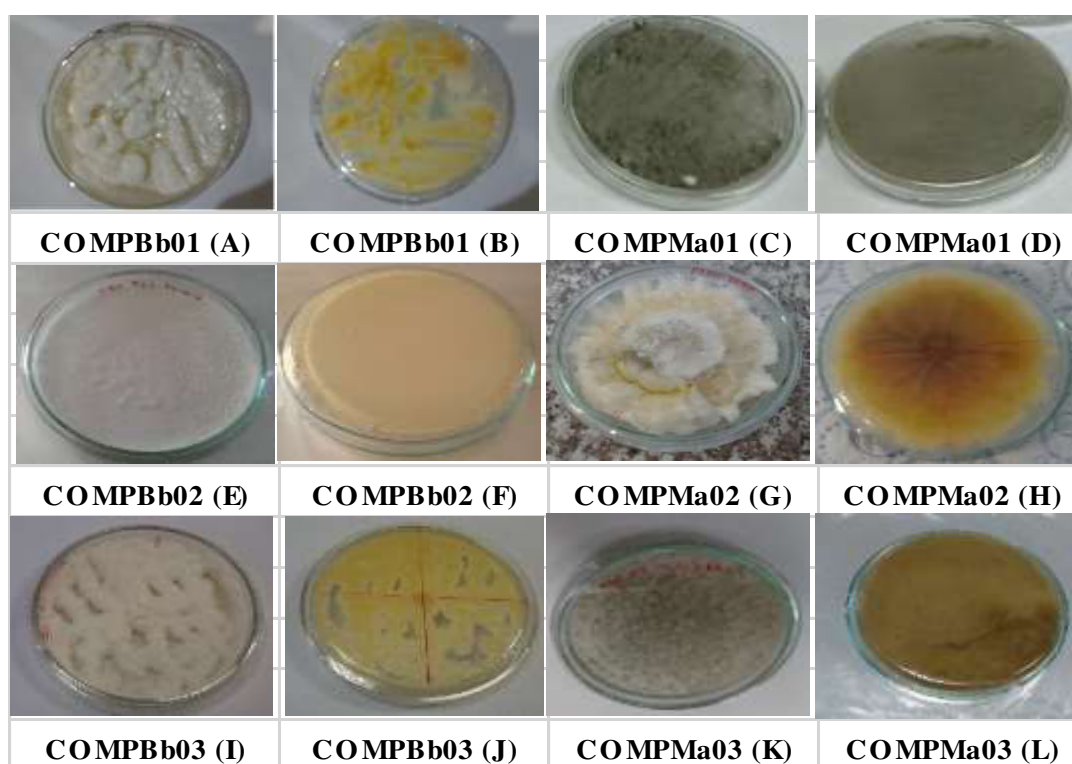


Figura 8. Imágenes del cultivo de las colonias aisladas de *B. bassiana* (A y B; E y F; I y J) y *M. anisopliae* nativas (C y D; G y H; K y L), observadas en el haz y envés de las cajas de Petri.

Las colonias de *B. bassiana* codificadas como COMPBb01 y COMPBb03; en el medio de cultivo SDA, presentaron las mismas características morfológicas;

mientras que COMPBb02, mostró diferencias en el color, fue blanquecina mate, el aspecto polvoriento, la superficie plana y los bordes definidos. La base presentó un matiz rosado tenue, sin presencia de exudado. Los resultados morfológicos de las colonias de *B. bassiana*, son similares a las reportadas por Castillo *et al.* (2014), así como el aspecto blanco algodonosa de las colonias y la pigmentación de color amarillo del cultivo (ver Figura 8).coincidieron con los datos expresados por Pariona *et al.* (2007).

Las colonias del *M. anisoplie* codificadas como COMPMa01, COMPMa02 y COMPMa03; los primeros días del crecimiento en el medio de cultivo PDA modificado, fueron circulares, blancas y algodonosas. Luego, se tornó de verde oliva en el haz del cultivo a verde oliva oscura en el envés de COMPMa01. El color de la colonia en el haz de COMPMa02 fue amarillenta y el envés marrón. En COMPMa03 la colonia presentó un matiz verde oliva tenue en el haz y en el envés un color marrón oscuro. Las tres cepas de *M. anisopliae* no presentaron exudados.

Según, Wyrebek *et al.* (2011); Bautista *et al.* (2012); Bhoosreddy (2014) y Valle (2015) las colonias de *M. anisopliae* se identifican por el color blanco algodonoso, que luego se tornan verdes, característica indicativa de las colonias esporuladas que le han categorizado como el hongo de la muscardina verde. Fernandes *et al.* (2010) de su investigación informan, que las colonias del aislamiento de *M. anisoplie*, presentan un borde blanco de espesor variable y la base de la mayoría de las colonias son de color parduzco o anaranjado, características morfológicas afines a las obtenidas por los aislamientos nativos de la presente investigación.

De acuerdo a las claves taxonómicas de Brady, 1979; Hoog, 2000; Domsch *et al.* 2007 & Rehner *et al.* 2011, el género *Metarhizium* presenta las características morfológicas siguientes: la colonia muestra un matiz blanco y algodonoso al inicio, luego se tornan de color amarillo verdosas a verde oliva oscuro; costroso con regiones miceliares aéreas abundante, de matiz blanquecino. La base (envés) de la colonia amarillo intenso. Los resultados

de la determinación de las características macro morfológicas de las tres cepas de *M. anisopliae* concuerdan con estas claves taxonómicas.

El resumen de las características macroscópicas de las colonias aisladas de los hongos entomopatógenos nativos (ver Cuadro 16).

Cuadro 16. Características macroscópicas de las colonias aisladas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos.

Código de cepa	Lugar de origen del hospedero (insecto plaga)	Características de las colonias
	Fincas subtropicales	Macroscópicas
COMP-Bb01	Provincia Los Ríos-cantón Ventanas-Los Ángeles. <i>Hypothenemus hampei</i> . (1)	En SDA: colonia blanca aspecto algodonosa brillante, superficie semi elevada y bordes definidos. El envés de matiz amarillo y presenta exudado.
COMP-Bb02	Provincia Napo-Tena-Apuya. <i>Hypothenemus hampei</i> . (2)	En SDA: colonia blanquecina mate de aspecto polvoriento, superficie plana y bordes definidos. El envés de matiz rosado tenue, sin presencia de exudado.
COMP-Bb03	Provincia-Bolívar-Echeandía – Cena <i>Hypothenemus hampei</i> . (3)	En SDA: colonia blanca aspecto algodonosa brillante, superficie semi elevada y bordes definidos. El envés de matiz amarillo y presenta exudado.
COMP-Ma01	Provincia Los Ríos-cantón Ventanas-Los Ángeles. <i>Mahanarva andigena</i> . (1)	En PDA modificada: colonia redonda, blanca y algodonosa al inicio, luego verde oliva por la presencia de abundantes conidios. El envés de matiz verde oliva oscuro, no existe exudado.
COMP-Ma02	Provincia-Pastaza-Puyo-Teniente Hugo Ortiz. <i>Mahanarva andigena</i> . (4)	En PDA modificada: colonia blanca y algodonosa al inicio, luego amarillenta por la presencia de conidios. El envés marrón, no existe exudado.
COMP-Ma03	Provincia-Bolívar-Echeandía – Cena <i>Mahanarva andigena</i> . (3)	En PDA modificada: colonia blanca y algodonosa al inicio, luego verde oliva tenue por la presencia de abundantes conidios. El envés marrón oscuro, no existe exudado.

4.1.1.3. Descripción microscópica del hongo entomopatógeno *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Se fundamentó en el análisis de las características microscópicas del hongo, las estructuras reproductivas (conidióforos y conidios) y la dimensión de los conidios.

El hongo entomopatógeno con el código COMPBb01, exhibió abundante micelio septado, conidios y conidióforos. En COMPBb02, la presencia de los micelios fue escasa, la presencia de conidos fue considerable. En COMPBb03, se visualizaron muy pocos hifas y los conidios fueron escasos. Los conidios de todos los aislamientos ensayados se caracterizaron por ser globosos, hialinos y lisos (ver Figura 9).

De esta manera se coincide con lo expuesto por Vargas (2003), quien encontró que los conidios de *B. bassiana* son de forma globosos, hialinos, lisos; células conidiógenas globulares a subglobulares, formando conidióforos muy cercanos. Son los parámetros morfológicos más utilizados para diferenciarla de la *B. brongniartii*.

En las tres cepas del hongo *M. anisopliae*, se observaron en el campo óptico coincidencias en la disposición espacial de los conidios, algunos se presentaron aislados y otros agrupadas formando cadenas. La forma fue cilíndrica con puntas redondeadas. Hubo diferencia en el color y la dimensión de los conidios entre COMPMa01 (matiz verde oliva) y la cepa COMPMa02 (mostró un matiz de verde oliva a verde amarillento) y en COMPMa03 matices verde claro a verde oliva (ver Figura 9).

Las características micro morfológicas de las tres cepas de *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin de la prente investigación, están en correspondencia con lo manifestado por Claro, Ramos, & Pérez (2006): el conidióforo posee verticilos de 2-3 ramales en cada uno, con matices verde olivo oscuro que aclara al ápice. Según Guerrero, Carrillo & Aguilera (1999), los conidios pueden ser de sub hialinos a verdes, cilíndricos a elipsoidales, con las puntas redondeadas, en forma aislada o formando cadenas.

De acuerdo a Humber (2012), la forma y color de los conidios de *M. anisopliae* concuerdan con las cepas nativas aisladas en la presente investigación.

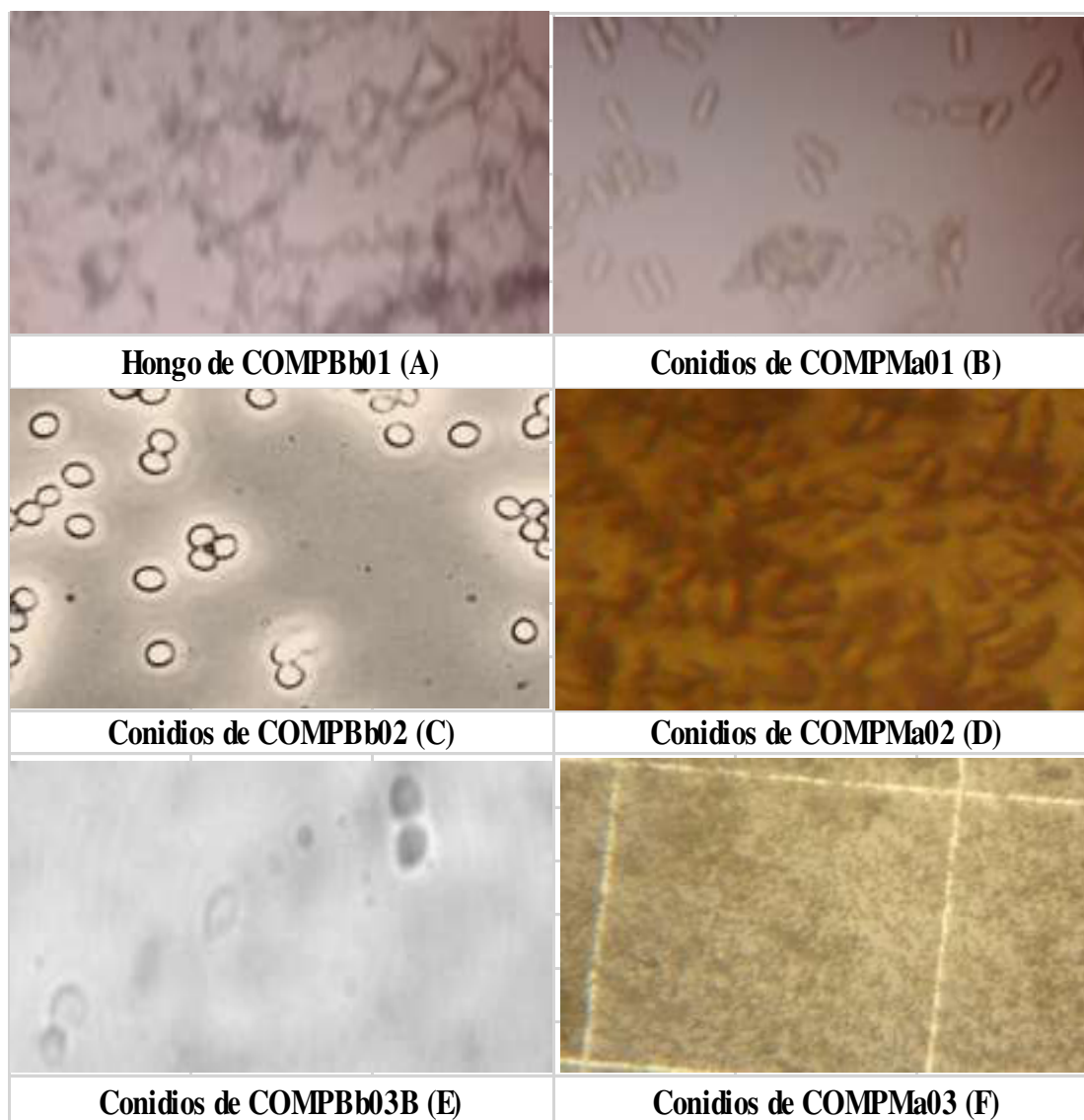


Figura 9. Estructura microscópica de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas.

4.1.1.3.1. Dimensión de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Los resultados de la longitud y ancho de los conidios, se ejecutaron como complemento microscópico de los hongos entomopatógenos (ver Cuadro 17).

Cuadro 17. Dimensión de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Longitud μm	Ancho μm	Longitud μm	Ancho μm
<i>B. bassiana</i> 01 (μm)		<i>M. anisopliae</i> 01 (μm)	
2,80	2,30	7,60	3,50
1,30	3,00	8,00	3,80
3,20	2,90	6,30	3,50
3,40	2,40	7,40	3,20
2,70	2,20	7,90	3,70
2,90	1,00	9,00	4,00
3,00	3,30	8,40	3,30
2,90	2,40	8,20	3,50
3,50	2,40	7,80	3,10
4,10	2,30	9,00	3,30
<i>B. bassiana</i> 02 (μm)		<i>M. anisopliae</i> 02 (μm)	
2,70	2,10	8,00	3,10
2,50	1,90	6,00	2,90
2,60	1,80	5,40	2,80
2,80	2,40	7,80	3,20
3,90	2,90	8,10	2,60
2,90	2,10	7,50	3,20
2,50	1,90	6,90	3,20
2,70	2,00	9,10	3,50
3,00	2,70	8,50	3,00
<i>B. bassiana</i> 03 (μm)		<i>M. anisopliae</i> 03 (μm)	
2,70	2,40	8,00	2,40
2,80	2,00	5,50	2,20
2,70	2,20	4,90	2,90
2,80	2,70	5,10	2,70
2,50	2,50	6,60	2,70
2,40	2,90	4,00	2,10
3,00	2,40	3,00	1,80
2,10	2,00	4,90	3,00
2,40	2,00	5,30	2,40
2,00	2,60	4,80	2,60

Los promedios, valores máximos y mínimos del conidio de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (ver Cuadro 18).

Cuadro 18. Promedios de la dimensión de conidios en *B. bassiana* y *M. anisopliae*

	COMPb01		COMPMa01	
	Longitud μm	Ancho μm	Longitud μm	Ancho μm
Promedios	2,98	2,42	7,96	3,49
Mínimo	1,30	1,00	6,30	3,10
Máximo	4,10	3,30	9,00	4,00
	COMPb02		COMPMa02	
	Longitud μm	Ancho μm	Longitud μm	Ancho μm
Promedios	2,83	2,20	7,27	2,99
Mínimo	2,50	1,80	5,40	2,50
Máximo	3,90	2,90	9,10	3,50
	COMPb03		COMPMa03	
	Longitud μm	Ancho μm	Longitud μm	Ancho μm
Promedios	2,52	2,37	4,90	2,49
Mínimo	2,00	2,00	3,00	1,80
Máximo	3,00	2,90	6,60	3,00

En el Cuadro 18, se observan los promedios de la longitud y ancho de los conidios de *B. bassiana*, en COMPb01, 02 y 03 fueron $2.98 \times 2.42 \mu\text{m}$, $2.83 \times 2.20 \mu\text{m}$ y $2.52 \times 2.37 \mu\text{m}$, respectivamente. Los valores máximos en COMPb01 ($4.10 \times 3.30 \mu\text{m}$) superó a los valores de COMPb02 ($3.90 \times 2.90 \mu\text{m}$) y COMPb03 ($3.00 \times 2.90 \mu\text{m}$). Los mínimos de COMPb01 ($1.30 \times 1.00 \mu\text{m}$), fue superado por COMPb02 ($2.50 \times 1.80 \mu\text{m}$) y COMPb03 ($2.00 \times 2.00 \mu\text{m}$).

El valor promedio de los conidios de *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin obtenido en esta investigación, se encuentra dentro del rango establecido por Cañedo & Ames, 2004 ($2 \text{ a } 3 \times 2 \text{ a } 2.3 \mu\text{m}$).

En el mismo cuadro, los valores de *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, en COMMa01, 02 y 03 fueron $7.96 \times 3.49 \mu\text{m}$, $7.27 \times 2.99 \mu\text{m}$ y $4.90 \times 2.49 \mu\text{m}$, respectivamente. Los valores máximos en COMMa01 ($9.00 \times 4.00 \mu\text{m}$) superaron a los valores de COMPMa02 ($9.10 \times 3.50 \mu\text{m}$) y COMPMa03 ($6.60 \times 3.00 \mu\text{m}$). Los mínimos de COMPMa01 ($6.30 \times 3.10 \mu\text{m}$), predominaron en COMPMa02 ($5.40 \times 2.50 \mu\text{m}$) y COMPMa03 ($3.00 \times 1.80 \mu\text{m}$). Los promedios de la dimensión de conidios de este estudio, se encuentran dentro de los valores determinados por Cañedo & Ames, 2004 ($3.5 \text{ a } 9 \mu\text{m} \times 1.5 \text{ a } 3.5 \mu\text{m}$);

así como los reportados por Fernandes *et al.* (2010); Humber (2012) y (Valle, 2015). Cuyos rangos se localizan en el rango de 5, 92 (7,59-2,77) x 2,7 (3,70-2,03) μm y 9,22 (10.93-7,77) x 5, 40 (7,40-3,88) μm , quienes citan que las principales especies de *M. anisopliae* tienen conidios $\leq 9 \mu\text{m}$.

En lo referentes a la longitud y ancho de los conidios de *M. anisopliae*, obtenidos en el presente estudio, se encuentra muy próximos al rango indicado por Balachander *et al.* (2012), quienes, hallaron una relación entre 8,46 a 9,90 μm en longitud y de 2,56 a 3,90 μm en ancho para el hongo entomopatógeno *Metarhizium spp.* (Valle, 2015).

Los resultados del análisis de varianza para la longitud y ancho de los conidios (ver Cuadro 19).

Cuadro 19. Análisis de varianza de la dimensión de conidios entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Efectos Principales					
A: Dimensión	0,240667	1	0,240667	0,40	0,5320
B: Hongo EP	294,797	5	58,9595	97,08	
Interacciones					
AB	12,5093	5	2,50187	4,12	0,0034
Residuos	29,152	48	0,607333		
Total Corregido	336,699	59			

Del ANOVA se deduce que entre el factor dimensión de conidios y hongos entomopatógenos (AB), existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%, con un p-valor de 0,034.

El resumen de los resultados obtenidos de las características microscópica obtenidas del hongo *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas (ver Cuadro 20).

Cuadro 20. Características microscópicas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas.

Código de la cepa	Lugar de origen del hospedero (insecto plaga)	Características del hongo (Conidios)
	Fincas subtropicales	Microscópicas
COMP-Bb01	Provincia Los Ríos-cantón Ventanas-Los Ángeles. <i>Hypothenemus hampei</i> . (1)	Presencia de abundante micelio septado, conidióforos. Conidios hialinos globosos. Media de longitud y ancho de conidio: (2,98 × 2,42 µm)
COMP-Bb02	Provincia Napo-Tena-Apuya. <i>Hypothenemus hampei</i> . (2)	Escasa estructura micelial. Conidios hialinos. Longitud y ancho de conidio: (2,83 × 2,20 µm)
COMP-Bb03	Provincia-Bolívar-Echeandía – Cena <i>Hypothenemus hampei</i> . (3)	Pocas hifas. Presencia de conidios hialinos globosos. Longitud y ancho de conidio: (2,52 × 2,37 µm)
COMP-Ma01	Provincia Los Ríos-cantón Ventanas-Los Ángeles. <i>Mahanarva andigena</i> . (1)	Conidios unicelulares, separados o formando cadenas; cilíndricos con puntas redondeadas; de matiz verde oliva. Longitud y ancho de conidio: (7,96 × 3,49 µm)
COMP-Ma02	Provincia-Pastaza-Puyo-Teniente Hugo Ortiz. <i>Mahanarva andigena</i> . (4)	Conidios unicelulares, separados o formando cadenas; cilíndricos con puntas redondeadas; de matiz verde oliva a verde amarillento. Longitud y ancho de conidio: (7,27 × 2,99 µm)
COMP-Ma03	Provincia-Bolívar-Echeandía – Cena <i>Mahanarva andigena</i> . (3)	Conidios unicelulares, separados o formando cadenas; cilíndricos con las puntas redondeadas; de matices verde claro a verde oliva. Longitud y ancho de conidio: (4,90 × 2,49 µm)

4.1.2. Identificación de la especie *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin nativas.

La observación de las características macro morfológicas de las colonias, la visualización de la estructura del hongo al microscopio de cada una de las cepas por sitio de muestreo y en base a las claves taxonómicas de Brady

(1979); Hoog (2000); Ames & Cañedo (2004); Domsch *et al.* (2007) y Rehner. (2011), permitieron la identificación morfológicamente pertenecientes a las especies *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin en las tres parroquias rurales en los subtrópicos del Ecuador experimentados.

Así mismo, la determinación de las características morfo fisiológicas del hongo *Metarhizium spp.*, y los fundamentos taxonómicos de Carmichael *et al.* (1980); Barnett & Hunter (1998); Ames & Cañedo (2004), Humber (2012) y Valle, 2015 (las estructuras reproductivas y dimensión del conidio) ratificaron que el entomopatógeno nativo, hospedero del insecto plaga salivazo de la caña de azúcar *M. andigena pertenece a la especie Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, en las tres parroquias rurales subtropicales del Ecuador ensayados.

4.1.3. Determinación del porcentaje de la pureza de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

El valor medio más elevado del porcentaje de la pureza en *B. bassiana* lo alcanzó la cepa COMPBb01 con el 98,6%, seguida de COMPBb02 (97,1%) y el 87,4% para la COMPBb03. En el *M. anisopliae*, la COMPMa01 obtuvo el 98,6 % a continuación la COMPMa02 con el 96,9 % y finalmente la media de la COMPMa03 fue el 89,6 %. Los resultados del porcentaje de la pureza (ver Cuadro 21).

De acuerdo a Castro (2015), el porcentaje de pureza para las formulaciones comerciales utilizadas en el biocontrol de insectos plaga, será superior al 90% y los microorganismos contaminantes permisibles no deben causar daño a los seres vivos ni al ambiente. Estos requerimientos, cumplieron las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* en la COMPBb01 y COMPBb02; COMPMa01 y COMPMa02, respectivamente.

Las cepas 03 en los dos casos, obtuvieron rendimientos inferiores a los indicados por el autor, posiblemente este hecho se originó a causa de

susceptibilidad a la contaminación por microorganismos oportunistas que presentaron los hongos durante la producción masiva.

Cuadro 21. Promedio del porcentaje de la pureza de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Código de cepa	Repetición	Hongo *EP	Hongo **C.	Hongos Totales	Promedio	Porcentaje de pureza (%)
(UFC/mL)						
COMPBb01	1	273	3	276	301	98,6
	2	200	4	204		
	3	389	5	394		
	4	289	3	292		
	5	331	6	337		
COMPBb02	1	273	8	281	258	97,1
	2	196	6	202		
	3	299	5	304		
	4	289	9	298		
	5	197	9	206		
COMPBb03	1	293	15	308	287	87,4
	2	305	9	314		
	3	301	5	306		
	4	288	6	294		
	5	205	8	213		
COMPMa01	1	288	5	293	282	98,6
	2	187	6	193		
	3	401	5	406		
	4	306	6	312		
	5	204	4	208		
COMPMa02	1	196	5	201	223	96,9
	2	190	6	196		
	3	203	5	208		
	4	204	9	213		
	5	289	10	299		
COMPMa03	1	103	10	113	146	89,6
	2	124	15	139		
	3	112	12	124		
	4	140	20	160		
	5	176	19	195		

*EP = Entomopatógeno. ** Hongo contaminante

4.1.4. Determinación *in vitro* de la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en la mezcla de arroz y maíz.

4.1.4.1. Conservación de las cepas puras de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para la producción *in vitro*. Para la valoración de los hongos entomopatógenos ensayados, se operaron con las cepas puras de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, conservadas en ultra congelación a la temperatura de -84°C en una solución estéril de glicerol al 15% de concentración (ver Figura 10).



Figura 10. Conservación de las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

La conservación de las cepas, se llevó a cabo para preservar la pureza y viabilidad de los conidios, los mismos que se utilizaron en la producción *in vitro* y masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos.

4.1.4.2. Producción *in vitro* de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en la mezcla de arroz y maíz.

La producción *in vitro* de los hongos entomopatógenos de las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (ver Figura 11), se determinó a partir del recuento de conidios en la cámara de Neubauer, se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Los resultados (ver Cuadro 22 y 23).

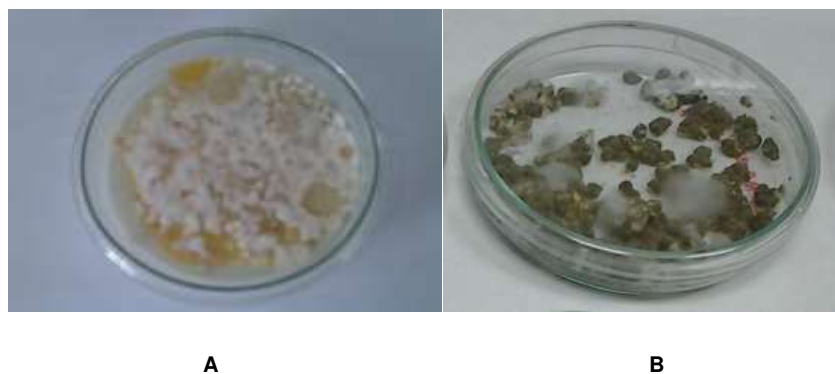


Figura 11. Cultivos *in vitro* de *B. bassiana* (A) y *M. anisopliae* (B) en la Mezcla arroz y maíz.

Cuadro 22. Promedio de la producción *in vitro* de *B. bassiana*.

Código Cepa/*Repetición	Promedio lecturas cámara Neubauer/Cuadrante						Producción Total/Cámara	Promedio Producción
							(1.0E+9 Conidios/g)	
COMPBb01	C 1	C 2	C 3	C1	C 2	C 3		
*R1	330	600	310	610	380	630	477	
R2	345	340	360	350	335	322	342	
R3	340	780	480	640	360	710	552	
R4	312	630	312	595	322	624	466	
R5	64	106	90	88	74	101	87	
COMPBb02							385	3,8E+09
R1	303	400	290	420	368	410	365	
R2	316	330	320	333	314	301	319	
R3	310	380	401	413	339	410	376	
R4	302	430	307	395	301	321	343	
R5	106	98	94	87	69	99	92	
COMPBb03							299	3,0E+09
R1	150	205	220	210	248	204	206	
R2	157	136	260	232	211	203	200	
R3	169	208	201	214	239	210	207	
R4	269	301	207	302	304	211	266	
R5	89	100	78	77	70	79	82	
							192	1,9E+09

Del Cuadro 22. Se observó que el máximo promedio en la producción de conidios *in vitro* de *B. bassiana* alcanzó la cepa COMPBb01, con una concentración de $3,8 \times 10^9$ conidios/g, seguida por COMPBb02 ($3,0 \times 10^9$ conidios/g) y COMPBb03 ($1,9 \times 10^9$ Conidios/g).

El promedio más elevado en la producción del *M. anisopliae*, obtuvo la cepa COMPMa01 ($4,8 \times 10^9$ conidios/g), continuado por COMPMa02 ($4,9 \times 10^9$ conidios/g) y COMPMa03 ($1,3 \times 10^9$ conidios/g). Demostrando así la capacidad de las dos primeras cepas para adaptarse y desarrollar las unidades infectivas *in vitro* (ver Cuadro 23).

Cuadro 23. Promedio de la producción *in vitro* de *M. anisopliae*.

CA28:I42ódigo Cepa/*Repetición	Promedio lecturas cámara Neubauer/Cuadrante						Producción Total/Cámara	Promedio Producción
							(1.0E+9 Conidios/g)	
COMPMa01	C 1	C 2	C 3	C1	C 2	C 3		
*R1	460	440	520	500	560	450	488	
R2	554	520	604	529	544	540	549	
R3	520	580	580	587	531	507	551	
R4	620	620	622	632	609	597	617	
R5	151	180	171	198	181	196	180	
COMPMa02							477	4,8E+09
R1	533	536	574	607	615	599	577	
R2	631	388	673	695	653	638	613	
R3	444	584	581	581	604	597	565	
R4	491	427	493	499	574	601	514	
R5	113	110	157	185	190	198	159	
COMPMa03							486	4,9E+09
R1	116	105	107	89	105	96	103	
R2	103	114	121	103	105	87	106	
R3	112	101	179	196	108	75	129	
R4	110	94	199	194	98	92	131	
R5	100	171	187	172	197	157	164	
							126	1,3E+09

Para la determinación de la existencia de las diferencias estadísticas significativas en la producción *in vitro* entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se realizó el análisis de varianza (ANOVA), los resultados (ver Cuadro 24).

Cuadro 24. Análisis de varianza de la producción *in vitro* entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Efectos Principales					
A: Producción	227271,0	1	227271,0	6,00	0,0153
B: Hongo *EP	85633,5	5	17126,7	0,45	0,8112
Interacciones					
AB	94227,5	5	18845,5	0,50	0,7777
Residuos	6,36227E6	168	37870,7		
Total (Corregido)	6,76941E6	179			

* EP = Entomopatógeno.

Con el ANOVA, se mide la contribución de cada factor en los tratamientos. Los p-valores comprueban la importancia estadística de cada uno de los factores. Dado que un p-valor es inferior a 0,05 (0,0153), este tiene efecto estadísticamente significativo en la producción de conidios *in vitro* entre la *B. bassiana* y el *M. anisopliae* cultivados en la mezcla de arroz y maíz (50:50 g) a un nivel de confianza de 95,0% (ver Cuadro 24).

Los promedios en la producción *in vitro*, se compararon mediante la prueba de contraste múltiple de rangos ($p \leq 0,05$). Los resultados (ver Cuadro 25).

Cuadro 25. Contraste múltiple de rangos de la producción *in vitro* entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Factor A	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	90	291,9	20,5131	x
2	90	362,967	20,5131	x
Contraste		Diferencias	+/- Límites	
1-2		*-71,0667	57,2709	

* indica una diferencia significativa.

Esta prueba aplica un método de comparación múltiple para la determinación de las medias que son significativamente diferentes unas de otras. En la parte

superior del Cuadro 25, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. Es el procedimiento de las diferencias estadísticas menores de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

En la parte inferior del mismo cuadro, se muestra que en el par 1-2 (*-72,0667), existe una diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza 95,0%.

4.1.5. Determinación crecimiento radial micelial de *B. bassiana* y *M. anisopliae* de la producción in vitro en la mezcla de arroz y maíz.

Al tercer día post inoculación, se efectuaron las mediciones del crecimiento radial micelial en diámetros perpendiculares por placa cada tres días hasta llegar a los 15 días. Los resultados (ver Cuadro 26).

Cuadro 26. Promedio del crecimiento radial de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (mm).

Promedio				Días			Promedio			Días		
<i>B. bassiana</i>		3	6	9	12	15	<i>M. anisopliae</i>	3	6	9	12	15
	Repeticiones	8,8	15,2	23,0	32,6	41,0		17,7	26,0	38,3	47,6	55,5
		11,5	17,0	23,0	31,8	40,8		14,5	24,5	33,6	43,8	52,2
		11,7	18,0	25,1	36,6	49,0		15,0	26,7	34,6	52,1	62,1
		12,6	21,5	25,2	33,7	37,7		13,8	26,9	35,5	51,2	66,7
		8,7	20,0	26,0	29,2	35,9		13,3	29,0	36,9	46,8	56,2
COMPBb01		10,7	18,3	24,5	32,8	40,9	COMPMa01	14,9	26,6	35,8	48,3	58,5
	Repeticiones	8,3	12,5	18,1	24,8	28,1		13,2	30,9	37,4	47,3	57,9
		8,7	16,0	22,0	25,2	29,9		11,3	26,6	35,3	46,8	44,4
		6,2	13,3	18,2	22,4	26,4		13,3	29,0	36,9	46,8	56,2
		9,5	14,2	20,5	47,3	51,6		17,6	31,1	37,5	55,7	65,2
		14,6	24,5	35,2	43,7	77,7		12,2	31,1	43,3	53,2	64,3
COMPBb02		9,5	16,1	22,8	32,7	42,7	COMPMa02	13,5	29,7	38,1	50,0	57,6
	Repeticiones	13,6	23,6	27,4	32,7	38,3		13,9	27,8	42,7	56,4	71,4
		14,0	22,6	33,7	46,6	59,5		14,7	29,7	35,0	48,6	53,7
		5,3	22,5	33,1	44,8	58,1		16,2	28,3	38,6	48,8	64,2
		8,7	21,0	30,0	43,2	57,9		12,0	29,0	40,7	54,4	57,9
		7,3	10,5	13,1	16,8	19,1		16,7	30,9	44,3	56,6	68,4
COMPBb03		9,8	20,0	27,5	36,8	46,6	COMPMa03	14,7	29,1	40,3	53,0	63,1

Las medidas del crecimiento radial (CR) a los 15 días se consideraron para el análisis estadístico de los hongos. La *B. bassiana*, cepa COMPBb01 alcanzó un promedio de 40,9 mm, la COMPBb02 42,7 mm y COMPBb03 46,6 mm, como se puede observar estos promedios y los obtenidos a los 3, 6, 9 y 12 días, mostraron una relación directamente proporcional entre el crecimiento radial micelial de las colonias y los días de incubación a 27°C (Cuadro 26).

Comparando los promedios del crecimiento radial (hasta crecimiento total de la caja de Petri), de los aislamientos BbTcf5 y BbTcf12 cultivados en SDA más extracto de levadura, elaborados por Gerónimo *et al.* (2016) quienes obtuvieron $3,38 \pm 0,03$ cm (33,8 mm) y $2,92 \pm 0,10$ cm (29,2 mm), respectivamente, a la temperatura de 25°C. Se observa que fueron inferiores a los obtenidos en el presente estudio; esta diferencia se debió a la temperatura (27°C) y el tiempo de incubación (15 días) que se utilizó en la presente investigación.

El crecimiento radial de *M. anisopliae*, cepa COMPMa03 en los 15 días de incubación fue 63,15 mm, promedio superior al notificado por Pik *et al.* (2009) quienes obtuvieron sobre PDA y SDA + Extracto de levadura al 1% un crecimiento radial entre 61,7 y 61,9 mm, a los 14 días de la cultivación. Esta diferencia se debe al medio de cultivo utilizado (PDA + Extracto de levadura al 5 %) y al día adicional de incubación. No obstante las cepas COMPMa01 (58,5 mm) y COMPMa02 (57,6 mm), exhibieron crecimientos radiales inferiores (Cuadro 26).

4.1.5.1. Determinación del análisis de varianza del crecimiento radial entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. El ANOVA, descompone la variabilidad del crecimiento radial debido al factor tiempo. Los P-valores comprueban la importancia estadística de cada uno de los factores. Dado que 2 p-valores son inferiores a 0,05, estos factores tienen efecto estadísticamente significativo en el crecimiento radial de las colonias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para un nivel de confianza 95,0% (ver Cuadro 27).

Cuadro 27. Análisis de varianza del crecimiento radial entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Coeficiente-F	P-Valor
Efectos Principales					
A:Hongo EP	5793,08	5	1158,62	21,93	0,0000
B: Crecimiento radial	28714,1	4	7178,51	135,89	0,0000
Interacciones					
AB	914,016	20	45,7008	0,87	0,6305
Residuos	6339,19	120	52,8266		
Total (corregido)	41760,3	149			

4.1.5.1.2. Determinación del contraste múltiple de rangos del crecimiento radial de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Se determinó las medias que son significativamente diferentes. Los resultados (ver Cuadro 28).

Cuadro 28. Contraste múltiple de rangos del crecimiento radial entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Hongo EP	Recuento	Media LS	Sigma Lx	Grupos homogéneos
2	25	24,756	1,45364	x
1	25	25,424	1,45364	x
3	25	28,136	1,45364	x
4	25	36,82	1,45364	x
5	25	37,78	1,45364	x
6	25	40,0364	1,45364	x
Contraste	Diferencias	+/- Límites		
1-2	0,668	4,07026		
1-3	-2,712	4,07026		
1-4	*-11,39,6	4,07026		
1-5	*-12,356	4,07026		
1-6	*-14,6124	4,07026		
2-3	-3,38	4,07026		
2-4	*-12,064	4,07026		
2-5	*-13,024	4,07026		
2-6	*-15,2804	4,07026		
3-4	*-8,684	4,07026		
3-5	*-9,644	4,07026		
3-6	*-119004	4,07026		
4-5	-0,96	4,07026		
4-6	-3,2164	4,07026		
5-6	-2,2564	4,07026		

* indica una diferencia significativa.

En la parte superior del Cuadro 28, se identificaron 2 grupos homogéneos, no existiendo (*) entre las medias. En parte inferior del mismo cuadro, los asteriscos que se encuentra al lado de los 9 pares indican que éstos presentan diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%.

4.1.6. Determinación de la producción en masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos en sustratos nutritivos Los resultados (ver Cuadro 29).

Cuadro 29. Promedios de la producción en masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos.

N° Ts	1	2	3	4	5
TRATAMIENTOS (T) COMBINADOS (1,0 x 10 ⁹ Conidios/g)	A1B1C1D1	A1B1C1D2	A1B1C2D1	A1B1C2D2	A1B2C1D1
	1,32	1,40	1,46	1,44	1,37
	6	7	8	9	10
	A1B2C1D2	A1B2C2D1	A1B2C2D2	A1B3C1D1	A1B3C1D2
	1,63	1,49	1,67	1,69	1,65
	11	12	13	14	15
	A1B3C2D1	A1B3C2D2	A1B4C1D1	A1B4C1D2	A1B4C2D1
	1,79	1,67	1,89	1,86	1,67
	16	17	18	19	20
	A1B4C2D2	A1B5C1D1	A1B5C1D2	A1B5C2D1	A1B5C2D2
	1,75	1,39	1,49	1,28	1,46
	21	22	23	24	25
	A2B1C1D1	A2B1C1D2	A2B1C2D1	A2B1C2D2	A2B2C1D1
	1,58	1,62	1,56	1,53	1,52
	26	27	28	29	30
	A2B2C1D2	A2B2C2D1	A2B2C2D2	A2B3C1D1	A2B3C1D2
	1,89	1,86	1,78	1,67	1,68
	31	32	33	34	35
	A2B3C2D1	A2B3C2D2	A2B4C1D1	A2B4C1D2	A2B4C2D1
	1,69	1,68	2,50	2,05	1,99
	36	37	38	39	40
	A2B4C2D2	A2B5C1D1	A2B5C1D2	A2B5C2D1	A2B5C2D2
	1,93	1,20	1,39	1,38	1,45

Códigos: A1 = Arroz. A2 = Maíz. B1 = Testigo. B2 = Harina de Amaranto, B3 = Harina de Soya, B4 = Leche en Polvo y B5 = Levadura. C1 = Concentración 1 (2,5-0,25) g y C2 (5,0-0,50) g = Concentración 2. D1 = *B. bassiana* y D2 = *M. anisopliae*. Fuente. **Merino (2015)**.

El máximo rendimiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae* cultivados en los sustratos sólidos con la adición de los suplementos nutritivos, lo reportó el T13 ($1,89 \times 10^9$ conidios/g), el T14 ($1,86 \times 10^9$ conidios/g), el T33 ($2,50 \times 10^9$ conidios/g) y el T34 ($2,05 \times 10^9$ conidios/g). Los resultados (ver Cuadro 27).

El mínimo rendimiento de la producción en *B. bassiana*, lo consiguió el T37 con un promedio $1,20 \times 10^9$ conidios/g, en arroz más la melaza y levadura a la concentración 1 (2,5 g 0,25 g) y el T39 con $1,38 \times 10^9$ conidios/ g en maíz más melaza y levadura, concentración 2 (5,0 g - 0,50 g). En el *M. anisopliae*, lo obtuvo el T1 (testigo absoluto) con un valor promedio de $1,32 \times 10^9$ conidios/g, en arroz y en maíz el T38 con una concentración de $1,39 \times 10^9$ conidios/ g, en los dos sustratos más melaza y levadura, concentración 1 (Ver Cuadro 27).

Para comparar los resultados de *B. bassiana*, se utilizaron los promedios de los testigos en arroz (T1-T4), el valor promedio obtenido fue $1,40 \times 10^9$ conidios/g, comparando este resultado con el reportado por Noboa y Quelal (2015), ellos lograron un promedio en arroz de $1,43 \times 10^8$ conidios/g, concentración inferior al obtenido en la presente investigación.

La producción en arroz del *M. anisoplie* fue $1,42 \times 10^9$ conidios/g (T2 y T4); comparado con el promedio reportado por Nussenbaum (2014) fue inferior ($1,18 \times 10^9$ conidios/g de arroz).

La diferencia en la producción de conidios en *B. bassiana* y *M. anisoplie*, se debió posiblemente a las condiciones medio ambientales donde se realizó el ensayo de la presente investigación.

La concentración de conidios, permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso (Mata, 2008), asimismo garantizar que la formulación contenga la cantidad de los conidios necesarios para controlar en el campo a los insectos, respetando la concentración recomendada de 10^{12} conidios/ha (Monzón, 2001).

4.1.6.1. Análisis de varianza de la producción en masa entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Se realizó esta exploración para evidenciar las diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Los resultados (ver Cuadro 30).

Cuadro 30. Análisis de varianza de la producción en masa entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Efectos Principales					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
A: Sustratos sólidos	0,16641	1	0,16641	15,96	0,0009
B: Suplementos nutritivos	1,53667	4	0,384166	36,85	0,0000
C: Concentración	0,00169	1	0,001	0,16	0,6922
D: Hongos EP	0,01296	1	0,08649	1,24	0,2804
Interacciones					
AB	0,205765	4	0,0514412	4,93	0,0080
AC	0,00144	1	0,00144	0,14	0,7147
AD	0,00961	1	0,00961	0,92	0,3504
BC	0,136835	4	0,0342087	3,28	0,0363
BD	0,120365	4	0,0300912	2,89	0,0542
CD	0,00289	1	0,00289	0,28	0,6053
Residuos	0,17721	17	0,0104241		
Total (Corregido)	2,37184	39			

Fuente. Merino (2015).

De los resultados del ANOVA, se deduce que como los p-valores son inferiores 0,05, existen diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%, en el factor sustratos sólidos (0,0009) y los suplementos nutritivos (0,0000). Además, en las interacciones AB (0,0080) y BC (0,0363), lo que significa que la adición de los suplementos nutritivos al arroz y maíz, influyeron en el incremento de la producción de conidios en *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos a nivel de laboratorio (Cuadro 30).

4.1.6.2. Comparación múltiple de medias de la producción en masa entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Esta técnica estadística, se realizó posterior al ANOVA con fin de establecer diferencias significativas entre las medias (Cuadro 31).

Cuadro 31. Comparación múltiple de rangos de la producción en masa entre *B. bassiana* y *M. anisopliae* (1×10^8 conidios/g).

(I) **SN: Fuente C y N	(J) SN: Fuente C y N	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Fuentes de Carbono y Nitrógeno	1	Fuentes de C y N	-11,0875	28,2472	,995	-92,300	70,125
	3		-20,2625	28,2472	,951	-101,475	60,950
	4		-103,3500*	28,2472	,007	-184,562	-22,138
	5		2,6625	28,2472	1,000	-78,550	83,875
	1		11,0875	28,2472	,995	-70,125	92,300
	3		-9,1750	28,2472	,997	-90,387	72,037
	4		-92,2625*	28,2472	,019	-173,475	-11,050
	5		13,7500	28,2472	,988	-67,462	94,962
	3		20,2625	28,2472	,951	-60,950	101,475
		Fuentes de C y N	9,1750	28,2472	,997	-72,037	90,387
	4		-83,0875*	28,2472	,043	-164,300	-1,875
	5		22,9250	28,2472	,925	-58,287	104,137
4	1		103,3500*	28,2472	,007	22,138	184,562
		Fuentes de C y N	92,2625*	28,2472	,019	11,050	173,475
	3		83,0875*	28,2472	,043	1,875	164,300
5	5		106,0125*	28,2472	,005	24,800	187,225
	1		-2,6625	28,2472	1,000	-83,875	78,550
		Fuentes de C y N	-13,7500	28,2472	,988	-94,962	67,462
	3		-22,9250	28,2472	,925	-104,137	58,287
	4		-106,0125*	28,2472	,005	-187,225	-24,800

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**SN (sustratos nutritivos): Fuente de Carbono y Nitrógeno.

Fuente. Merino. (2016).

Los resultados de la comparación múltiple de medias, como efecto de la adición de los suplementos nutritivos (fuente de carbono y nitrógeno) para la producción en masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se detalla como sigue:

En el par 1-4 y 4-1 la diferencia de medias (DM) fue $\pm 103,3500$ y una significancia (S) 0,007. En 1-4 y 4-1 la DM fue $\pm 92,2625$ y S de 0,019. En 3-4 y 4-3 la DM fue $\pm 83,0875$ y S de *0,043. Finalmente, en el par 4-5 y 5-4 la DM fue $\pm 106,0125$ y S de 0,005 (Cuadro 31).

Los resultados obtenidos, significa que la adición de los suplementos nutritivos como fuentes de carbono y nitrógenos en la relación (C10:N1), sobre los sustratos arroz y maíz, ostentaron diferencias estadísticas significativas (*) a $p \leq 0,05$ e intervalo de confianza de 95%, sobre el incremento de la producción de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el laboratorio (Cuadro 31). Aunque, no se encontraron valores de referencia similares a los obtenidos en este estudio; no obstante, se presenta una investigación referente a la relación carbono nitrógeno en la producción de hongos entomopatógenos.

Mustafá y Kaur. (2009), reportaron con la cepa UM2 de *M. anisopliae* una concentración de 1×10^9 conidios/cm² usando la relación C: N de 75:1, mientras que con una C: N de 35:1 obtuvieron 5.1×10^8 conidios/cm², la fuente de carbono que usaron fue la glucosa y la peptona como fuente de nitrógeno (Valencia, 2015). Como, se puede evidenciar controlar la relación carbono-nitrógeno, es fundamental para el incremento de los conidios.

4.1.7. Determinación fisiológica de *B. bassiana* y *M. anisopliae* de la producción en masa.

Para la evaluación fisiológica, se utilizaron las técnicas de control de la calidad microbiológica siguientes: la concentración y germinación (viabilidad) de los conidios (acápito 416), y el crecimiento radial micelial de las colonias.

4.1.7.1. Determinación del porcentaje de germinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Es de suma importancia la realización de este parámetro toda vez que en esta se visualiza como emerge el tubo germinativo *in vivo*, mismo que penetrará en la cutícula del insecto blanco. El resumen de los valores porcentuales (ver Cuadro 32).

Cuadro 32. Porcentaje de germinación de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Hongo entomopatógeno	Código cepa	Porcentaje de germinación (%)	D.E
<i>B. bassiana</i>	COMPBb01	97,2	0,8349
	COMPBb02	93,0	1,8727
	COMPBb03	73,3	11,0208
<i>M. anisopliae</i>	COMPMa01	98,2	0,3669
	COMPMa02	96,0	1,6008
	COMPMa03	80,8	10,1944

De acuerdo al Cuadro 30, el porcentaje de germinación más alto en *B. bassiana*, fue en COMPBb01 (97,2%) a continuación la COMPBb02 (93,0%) y el más bajo lo obtuvo la COMPBb03 (73,2%). En el *M. anisopliae* la COMPMa01 (98,2%), luego la COMPMa02 (96,0%) y la COMPMa03 (80,8%).

De acuerdo a Zimmermann (2007), el porcentaje germinación (viabilidad) de los conidios para la utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control microbiano debe ser superior al 90%. Se, compara este porcentaje con los obtenidos en el presente ensayo y se determinó que las cepas COMPBb01 - Bb02 y COMPMa01 - Ma02 están dentro de los parámetros establecidos para ser utilizados como el principio activo para bioformulados.

La evaluación de la viabilidad y la concentración de conidios es determinante en el proceso de evaluación de las formulaciones de bioplaguicidas, pues a partir de ésta se determina el tiempo que el producto puede durar en condiciones de almacenamiento. La viabilidad del hongo es fundamental en el campo, pues el efecto sobre la población de insectos objetivos debe ser rápida para disminuir el tiempo de exposición a condiciones ambientales (Malpartida *et al.*, 2013).

4.1.7.1.1. Análisis de varianza de la germinación entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. En el Cuadro 33, se observa que existió diferencias significativas ($p < 0,05$) en los tratamientos con un nivel de confianza de 95,0% entre las cepas de *B. bassiana* (0,0002) y *M. anisopliae* (0,0030) para los porcentajes de germinación evaluados.

Cuadro 33. Análisis de varianza de la germinación entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Hongo entomo patógeno	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Germinación <i>B. bassiana</i>	Entre grupos	1634,05	2	817,026	19,52	0,0002
	Intra grupos	502,644	12	41,887		
	Total corregido	1959,46	14			
Germinación <i>M. anisopliae</i>	Entre grupos	903,175	2	451,587	9,82	0,0030
	Intra grupos	551,8	12	45,9833		
	Total corregido		14			

4.1.7.1.2. Comparación múltiple de medias de la germinación entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Se realizó para la comprobación de la significancia entre las medias. Los resultados (ver Cuadro 34).

Cuadro 34. Comparación múltiple de medias de la germinación entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Variable dependiente	(I) B.b	(J) B.b	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Germinación <i>B. bassiana</i> (B.b).	B. b	2	4,2000	4,0933	,575	-6,720	15,120
		3	23,9400*	4,0933	,000	13,020	34,860
	2	B.b	-4,2000	4,0933	,575	-15,120	6,720
		3	19,7400*	4,0933	,001	8,820	30,660
	3	B.b	-23,9400*	4,0933	,000	-34,860	-13,020
		2	-19,7400*	4,0933	,001	-30,660	-8,820
Germinación <i>M. anisopliae</i> (M. a).	M. a	2	2,2000	4,2887	,867	-9,242	13,642
		3	17,4500*	4,2887	,004	6,008	28,892
	2	M. a.	-2,2000	4,2887	,867	-13,642	9,242
		3	15,2500*	4,2887	,010	3,808	26,692
	3	M. a	-17,4500*	4,2887	,004	-28,892	-6,008
		2	-15,2500*	4,2887	,010	-26,692	-3,808

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Los resultados, se detalla a continuación: Para las cepas de *B. bassiana*, en el par 1-3 y 3-1 la diferencia de medias (DM) fue $\pm 23,9400$ y una significancia (S) de $*0,000$; y en 2-3 y 3-2 la DM fue $\pm 19,7400$ y S de $*0,001$. Para *M. anisopliae* en el 1-3 y 3-1 la DM fue $\pm 17,4500$ y una $*0,004$; y en el par 2-3 y 3-2 la DM fue $\pm 15,2500$ y S de $*0,010$ (Cuadro 32).

Por lo expuesto, se confirma que existieron diferencias estadísticas significativas (*) a $p \leq 0,05$ e intervalo de confianza de 95%, en el porcentaje de germinación y consecuentemente en la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos.

4.1.7.2. Crecimiento radial de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en la producción en masa. Los resultados de COMPBb01 y COMPMa01 en el medio de cultivo SDA y PDA modificado, respectivamente a la temperatura de 27°C del tercer al décimo quinto día post inoculación (ver Cuadro 35).

Cuadro 35. Promedio del crecimiento radial micelial entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Código de				Días			Código de				Días		
<i>B. bassiana</i>		3	6	9	12	15	<i>M. anisopliae</i>	3	6	9	12	15	
	Repeticiones	16,8	14,6	12,1	50,0	59,0		29,0	48,4	55,0	59,7	68,0	
		15,9	29,1	32,0	47,0	58,5		31,8	44,1	55,0	66,0	79,7	
COMPBb01		17,2	32,3	40,6	51,1	55,1	COMPMa01	22,3	46,0	55,0	69,4	78,4	
		16,9	30,0	49,0	48,0	57,9		27,7	40,0	55,0	60,0	69,5	
		19,5	23,3	57,0	39,8	58,8		18,1	38,8	55,0	71,3	80,9	
Promedio (mm):		17,3	25,9	38,2	47,2	57,9	Promedio (mm):	25,8	43,5	55,0	65,3	75,3	

Los promedios del crecimiento radial de *B. bassiana*, cepa COMPBb01 a los 3, 6, 9, 12 y 15 días fueron: (17,3; 25,9; 38,2; 47,2 y 57,9) mm. En el *M. anisopliae*, cepa COMPMa01 lograron los siguientes promedios: (25,8; 43,5; 55,0; 65,3 y 75,3) mm. Para la comparación de los resultados obtenidos en el presente parámetro, se consideró el crecimiento de los 15 días.

El promedio del crecimiento radial de COMPBb01 nativa fue superior (57,9 mm) a los alcanzados por Elósegui *et al.* (2003), quien obtuvo un promedio entre 31,0 y 37,0 mm, a los quince días de incubación, esto se debe a que el hongo entomopatógeno estudiado fue cultivado en los sustratos nutritivos.

El comportamiento del aislamiento de *M. anisopliae* nativo (COMPMa01), referente al crecimiento radial fue similar, mostró un valor superior (75,3 mm) a los promedios reportados por Pik *et al.* (2009), quienes cultivaron los hongos sobre PDA y SDA más extracto de levadura al 1% y alcanzaron un crecimiento radial entre 61,7 y 61,9 mm, a los 14 días de incubación. Hecho que se debe, al cultivo del hongo entomopatógeno ensayado en la presente investigación en los sustratos nutritivos (agregación de fuentes de carbono y nitrógeno).

La velocidad de crecimiento de un hongo está determinada sobre todo por la capacidad del organismo de aprovechar las fuentes de nutrientes disponibles, de degradar las sustancias presentes en el sustrato de crecimiento y por la habilidad del metabolismo de actuar dentro del rango de factores nutricionales y abióticos entregado por el medio (Iskandarov *et al.*, 2006; Fargues *et al.*, 1992). En este contexto, Shah *et al.* (2005) y Safavi *et al.* (2007) afirman la tasa de crecimiento radial es una variable que depende de diversos factores, tales como el tipo de cepa utilizada, la naturaleza del sustrato donde crece el hongo y la relación C: N del sustrato utilizado, entre otros factores.

4.1.7.2.1. Determinación del análisis de varianza del crecimiento radial entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Los resultados procedentes de los hongos entomopatógenos (ver Cuadro 36). Como se puede observar, en éste cuadro existió diferencias significativas entre el crecimiento radial micelial de las colonias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a los quince días de incubación que duró el ensayo a un nivel de confianza de 95,0%.

Cuadro 36. Análisis de varianza del crecimiento radial micelial entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Coefficiente-F	P-Valor
Efectos Principales					
A: Tiempo (días)	21195,5	4	5298,87	3007,50	0,0000
B: Hongos	0,506002	1	0,506002	0,29	0,5944
Interacciones					
AB	10829,0	4	2707,24	1536,56	0,0000
Residuos	88,0943	50	1,76189		
Total (Corregido)	321113,0	59			

4.1.7.2.2. Contraste múltiple de rangos del crecimiento radial de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Los resultados (ver Cuadro 37).

Cuadro 37. Contraste múltiple de rangos del crecimiento radial micelial entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Medición cada 3 días	Recuento	Media LS	Sigma Lx	Grupos homogéneos	
1	12	20,5767	0,383176	x	
4	12	21,5075	0,383176	x	
3	12	31,1883	0,383176		x
2	12	45,4017	0,383176		x
5	12	71,0083	0,383176		x
Contraste	Diferencias	+/- Límites			
1-2	*-24,825	1,08843			
1-3	*-10,6117	1,08843			
1-4	-0,930833	1,08843			
1-5	*-50,4317	1,08843			
2-3	*14,2133	1,08843			
2-4	*23,8942	1,08843			
2-5	*-25,6067	1,08843			
3-4	*9,68083	1,08843			
3-5	*-39,82	1,08843			
4-5	*-49,5008	1,08843			

* indica una diferencia significativa.

En la parte superior del Cuadro 35, se identifican 4 grupos homogéneos, lo que significa que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias. En la mitad inferior del mismo cuadro, presenta la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares,

de medias indica que éstos presentaron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95,0%.

4.1.8. Determinación biológica de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos.

Para la obtención de los resultados, se ensayaron a nivel de laboratorio durante 10 días, la patogenicidad y virulencia de los hongos nativos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la *H. hampei* y *M. andigena*, respectivamente; se confirmaron la mortalidad pasando los cadáveres a cámaras húmedas a la temperatura de 27°C durante 3 días para observar a los insectos micosados. La valoración de la virulencia se realizó a través de la Concentración Letal Cincuenta (CL₅₀) y Tiempo Letal Cincuenta (TL₅₀).

4.1.8.1. Patogenicidad de *B. bassiana* sobre *H. hampei* y la *M. andigena* por el *M. anisopliae* en el laboratorio. Se evaluó los efectos letales de tres aislamientos nativos de *B. bassiana* sobre adultos de la broca del café (*H. hampei*) y tres de *M. anisopliae* en las ninfas del tercer instar del salivazo de la caña de azúcar (*M. andigena*), frente a un testigo. Los resultados de los promedios del porcentaje de mortalidad corregida por Abbott de los insectos plagas por los hongos entomopatógenos en estudio (ver Cuadro 38 y 39).

Del Cuadro 36, se infiere que todos los aislamientos de *B. bassiana* fueron patógenos y se consiguió entre el 60 y 94% de mortalidad de la plaga a nivel de laboratorio. La cepa nativa COMPBb01 causó la muerte al 94% de la población de *H. hampei*, seguida de COMPBb02 con el 72% y la COMPBb03 el 60%. Contrastando los resultados alcanzados con el testigo, se observa que el porcentaje de mortalidad fue 4%, verificándose que el bioensayo, se encontró dentro del parámetro (10%) establecido por Ames & Cañada (2004), lo que significa que el experimento se condujo satisfactoriamente.

Cuadro 38. Mortalidad corregida de *H. hampei* por *B. bassiana*

	Días																				
N° de	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		Promedio de
Tratamientos	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	Mortalidad (%)
Testigo	Concentración 1×10 ⁷ Conidios/g																				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	10
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	1	10
	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
																				4	
COMPb01	0	0	2	2	2	2	4	4	6	6	10	10	18	18	18	10	20	11	20	11	100
	0	0	2	2	2	0	8	8	8	8	8	8	13	13	14	5	18	9	18	9	90
	0	0	2	2	2	2	2	2	4	4	6	6	15	15	16	8	20	11	20	11	100
	0	0	2	2	2	2	4	4	10	10	12	12	18	18	18	10	16	7	16	7	80
	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	14	14	23	23	20	12	20	11	20	11	100
																					94
COMPb02	0	0	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	8	8	10	5	14	8	14	8	70
	0	0	2	2	2	1	2	1	2	2	6	6	6	6	6	1	10	3	16	10	80
	0	0	2	2	2	2	4	4	4	4	4	4	10	10	10	5	5	5	14	8	70
	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	8	8	8	8	12	7	12	5	16	10	80
	0	0	2	2	4	4	4	4	4	4	6	6	6	6	8	3	8	1	12	5	60
																					72
COMPb03	0	0	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10	12	12	12	6	12	6	12	6	60
	2	2	4	4	4	3	6	6	6	6	10	10	10	10	10	4	10	4	10	4	50
	0	0	2	2	4	4	8	8	8	8	10	10	10	10	10	4	10	4	16	11	80
	2	2	4	4	6	6	8	8	8	8	10	10	12	12	12	6	12	6	12	6	60
	4	4	4	4	6	6	6	6	6	10	10	10	10	10	10	4	10	4	10	4	50
																					60

M: Mortalidad de la plaga.

MCA: Porcentaje de mortalidad corregida de Abbott.

Cuadro 39. Mortalidad corregida de *Mahanarva andigena* por *M. anisopliae*.

	Días																				
N° de	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		Promedio de
Tratamientos	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	M	MCA	Mortalidad (%)
	Concentración 1:10 ⁷ Conidios/g																				
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	10
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	2	1	10
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	10
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	2	1	10
COMPma01																					8
	0	0	2	2	2	2	4	4	6	6	10	10	18	18	18	10	20	11	20	11	100
	0	0	2	2	2	2	8	8	8	8	8	8	23	23	20	12	20	11	20	11	100
	0	0	2	2	2	2	2	2	4	4	6	6	20	20	20	12	20	11	20	11	100
	0	0	2	2	2	2	4	4	10	10	12	12	23	23	20	12	20	11	20	11	100
	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	14	14	25	25	20	12	20	11	20	11	100
COMPma02																					100
	0	0	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	10	10	14	9	18	12	18	12	90
	0	0	2	2	2	1	2	1	2	2	6	6	12	12	12	7	16	10	16	10	80
	0	0	2	2	2	2	4	4	4	4	4	4	14	14	14	9	14	8	14	8	70
	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	8	8	16	16	16	12	16	10	16	10	80
	0	0	2	2	4	4	4	4	4	4	6	6	6	6	8	3	16	10	20	14	100
COMPma03																					84
	0	0	2	2	4	4	6	6	8	8	10	10	12	12	12	6	12	6	16	11	80
	2	2	4	4	4	3	6	6	6	6	10	10	10	10	10	4	10	4	14	9	70
	0	0	2	2	4	4	8	8	8	8	10	10	10	10	10	4	10	4	16	11	80
	2	2	4	4	6	6	8	8	8	8	10	10	12	12	12	6	12	6	14	9	70
	4	4	4	4	6	6	6	6	10	10	10	10	10	10	10	4	10	4	18	13	90
																					78

M: Mortalidad de la plaga.

MCA: Porcentaje de mortalidad corregida de Abbott.

Del mismo modo, los promedios del porcentaje de mortalidad corregida de *Mahanarva andigena* por los tres aislamientos de *M. anisopliae* nativos fueron patógenos, se obtuvo valores porcentuales entre el 78 y 100% de mortalidad de la población plaga.

Considerando individualmente los valores de la mortalidad de la plaga, tenemos que la cepa nativa COMPMa01 causó la muerte al 100% de la población de *M. andigena*, seguido por COMPMa02 con el 84% y la COMPMa03 el 78%. Confrontando con el testigo, se observa que el porcentaje de mortalidad fue de 8%, resultados que se encuentran dentro de los valores establecidos por Ames & Cañedo (2004), quienes informan que los valores porcentuales de los testigos no deben superar el 10 % de mortalidad de los prototipos del bioensayo (Ver Cuadro 39).

4.1.8.1.1. Análisis de varianza de la mortalidad corregida entre *H. hampei* y *M. andigena* por *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Los resultados del bioensayo (ver Cuadro 40).

Cuadro 40. Análisis de varianza de la mortalidad corregida entre *H. hampei* por *B. bassiana* y *M. andigena* por *M. anisopliae*.

Insectos	Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
<i>H. hampei</i>	Entre grupos	22055,0	3	7351,67	89,11	0,0000
	Intra grupos	1320,0	16	82,5		
Total corregido		23375,0	19			
<i>M. andigena</i>	Entre grupos	24895,0	3	8298,33	150,88	0,0000
	Intra grupos	889,0	16	55,0		
Total corregido		25775,0	19			

Del ANOVA, se observa que los P-valor para la mortalidad de los insectos plaga por *B. bassiana* y *M. anisopliae* fue 0,0000 y *M. andigena* también 0,0000, valores inferiores a $p \leq 0,05$ del nivel de significancia; por lo tanto, existieron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de 95% (Cuadro 40).

4.1.8.1.2. Contraste múltiple de rangos de la mortalidad entre *H. hampei* y *M. andigena* por *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Este test, se aplicó para determinar la significancia entre las medias (ver Cuadro 41).

Cuadro 41. Contraste múltiple de rangos de la mortalidad corregida entre *H. hampei* por *M. andigena*.

Nº Tratamientos	Frecuencia	Medias	Grupos homogéneos
<i>H. hampei</i>			
1	5	4,0	x
4	5	60,0	x
3	5	72,0	x
2	5	94,0	x
<i>M. andigena</i>			
5	5	8,0	x
8	5	78,0	x
7	5	84,0	x
6	5	100,0	x
<i>H. hampei</i>			
Contraste	Diferencias	+/- Límites	
1-2	*-90,0	12,178	
1-3	*-68,0	12,178	
1-4	*-56,0	12,178	
2-3	*-22,0	12,178	
2-4	*-34,0	12,178	
3-4	*12,0	12,178	
<i>M. andigena</i>			
5-6	*-92,0	12,178	
5-7	*-76,0	12,178	
5-8	*-70,0	12,178	
6-7	*16,0	12,178	
6-8	*22,0	12,178	
7-8	6,0	12,178	

* indica una diferencia significativa

En la parte superior del Cuadro 39, se identificaron 3 grupos de medias homogéneas tanto en *H. hampei* como en *M. andigena*, como no significantes. En La mitad inferior del mismo cuadro, todos los pares de medias en *H. hampei* con el asterisco en la parte superior del número fueron significativos, igual para *M. andigena* a excepción del par de medias 7-8 que no presentó significancia a un intervalo de confianza de 95%.

....4.1.8.2. Determinación de la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre *H. hampei* y *M. andigena* nativas a nivel de laboratorio.

Se eligieron los aislamientos nativos COMPBb01 y COMPMa01, cultivados en los sustratos nutritivos que presentaron las mayores mortalidades sobre los insectos plaga en los ensayos de la patogenicidad.

4.1.8.2.1. Determinación del porcentaje de mortalidad de *H. hampei* por *B. bassiana*. Los resultados porcentuales de la mortalidad durante 10 días post inoculación de las diferentes concentraciones de la cepa nativa COMPBb01 frente al tratamiento testigo (ver Cuadro 42).

Cuadro 42. Porcentaje de mortalidad de *H. hampei* por *B. bassiana* post inoculación (virulencia).

Tratamiento	Concentración de Conidios	Repetición	Días																Porcentaje de Mortalidad (%)				
			1		2		3		4		5		6		7		8			9		10	
			V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M		V	M	V	M
Testigo	ADE+Tween-80 0,01% (Ninguna)	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	10
		2	10	0	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	10
		3	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	10
		4	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	10
		5	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0
																						Promedio	6
COMPBB01	1 × 10 ⁵ Conidios/mL	1	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	10
		2	10	0	9	1	9	1	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	20
		3	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	10
		4	10	0	9	1	9	1	9	1	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	20
		5	10	0	10	0	10	0	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	10
																						Promedio	14
	1 × 10 ⁶ Conidios/mL	1	10	0	9	1	9	1	9	1	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	20
		2	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	9	1	10
		3	10	0	9	1	9	1	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	20
		4	9	1	9	1	9	1	9	1	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	8	2	20
		5	10	1	9	1	8	2	8	2	8	2	7	3	7	3	7	3	7	3	7	3	30
																						Promedio	20
	1 × 10 ⁷ Conidios/mL	1	10	0	9	1	8	2	7	3	6	4	5	5	4	6	4	6	4	6	5	5	50
		2	9	1	8	2	8	2	7	3	7	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	50
		3	10	0	9	1	8	2	6	4	6	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	50
		4	9	1	8	2	7	3	6	4	6	4	5	5	4	6	4	6	4	6	4	6	60
		5	8	2	8	2	7	3	7	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	50
																						Promedio	52
	1 × 10 ⁸ Conidios/mL	1	10	0	9	1	8	2	7	3	6	4	5	5	4	6	4	6	4	6	3	7	70
		2	9	1	8	2	8	2	7	3	7	3	6	4	6	4	6	4	6	4	6	2	80
		3	10	0	9	1	8	2	6	4	5	5	4	6	4	6	3	7	3	7	2	8	80
		4	9	1	8	2	7	3	6	4	6	4	6	4	4	6	4	6	2	8	1	9	90
		5	8	2	8	2	7	3	7	3	5	5	5	5	4	6	4	6	4	6	4	6	60
																						Promedio	76
	1 × 10 ⁹ Conidios/mL	1	9	1	8	2	8	2	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	100
2		8	2	6	4	6	4	1	9	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	100	
3		10	0	9	1	8	2	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	100	
4		9	1	8	2	7	3	2	8	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	100	
5		9	1	5	5	4	6	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	100	
																					Promedio	100	

4.1.8.2.2. Determinación del porcentaje de mortalidad de *M. andigena* por *M. anisopliae*. Los resultados del porcentaje de mortalidad durante 10 días post inoculación de las diferentes concentraciones de COMPMa01 nativa frente al tratamiento testigo (ver Cuadro 43).

Cuadro 43. Porcentaje de mortalidad de *M. andigena* por *M. anisopliae* post inoculación (virulencia).

	Concentración de conidias	Repetición	DÍAS										Porcentaje de Mortalidad
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
			V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	
Testigo	ADE+Tween-80 0,01% (Ninguna)	1	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
		2	10	0	10	0	9	1	9	1	9	1	9
		3	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
		4	10	0	10	0	10	0	9	1	9	1	9
		5	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
													Promedio
													8
	1×10^5 Conidios/mL	1	10	0	9	1	9	1	9	1	8	2	8
		2	10	0	9	1	9	1	9	1	9	1	9
		3	10	0	9	1	9	1	8	2	8	2	8
		4	9	1	9	1	9	1	9	1	8	2	8
		5	10	1	9	1	8	2	8	2	7	3	7
													Promedio
													26
COMPb01	1×10^6 Conidios/mL	1	10	0	9	1	8	2	7	3	6	4	5
		2	9	1	8	2	8	2	7	3	7	3	6
		3	10	0	9	1	8	2	6	4	5	5	4
		4	9	1	8	2	7	3	6	4	6	4	6
		5	8	2	8	2	7	3	7	3	5	5	5
													Promedio
													70
	1×10^7 Conidios/mL	1	9	1	7	3	6	4	6	4	6	4	6
		2	9	1	6	4	5	5	5	4	6	4	6
		3	10	0	8	2	6	4	5	5	5	4	6
		4	9	1	6	4	5	5	5	4	6	3	7
		5	8	2	8	2	5	5	5	5	5	4	6
													Promedio
													80
	1×10^8 Conidios/mL	1	10	0	9	1	8	2	7	3	6	4	5
		2	9	1	8	2	7	3	6	4	1	9	1
		3	10	0	9	1	6	4	5	5	4	6	2
		4	9	1	8	2	7	3	6	4	6	4	6
		5	8	2	8	2	7	3	7	3	5	5	5
													Promedio
													92
	1×10^9 Conidios/mL	1	9	1	4	6	2	8	0	10	0	10	0
		2	8	2	6	4	3	7	0	10	0	10	0
		3	5	5	4	6	3	7	0	10	0	10	0
		4	7	3	6	4	4	6	2	8	0	10	0
		5	3	7	2	8	1	9	0	10	0	10	0
													Promedio
													100

Los valores promedios de mortalidad de los insectos *H. hampei* y *M. andigena* en los testigos fueron el 6% y 8%; en la concentración 1×10^5 conidios/mL (14% y 26%); en 1×10^6 conidios/mL (20% y 70%); en 1×10^7 conidios/mL (52% y 80%); en 1×10^8 conidios/mL (76% y 92%); finalmente en la concentración 1×10^9 conidios/mL el (100% y 100%), respectivamente.

Como se puede observar de los resultados obtenidos de los cuadros anteriores, el porcentaje de mortalidad se incrementa paulatinamente a medida que se aumenta la concentración de la suspensión de conidios; es decir, que existió una relación directamente proporcional entre el porcentaje de mortalidad de las plagas versus (vs) la concentración de los hongos entomopatógenos (ver Figura 12).

La relación de la concentración-respuesta en el presente estudio, se ajustó a una curva sigmoidea, en la cual los tiempos de exposición fueron las variables independientes y los porcentajes de mortalidad las variables dependientes. Las curvas sigmoideas reflejaron que los valores de mortalidad acumulada de los insectos plaga se ajustaron a una distribución normal (ver Figura 12).

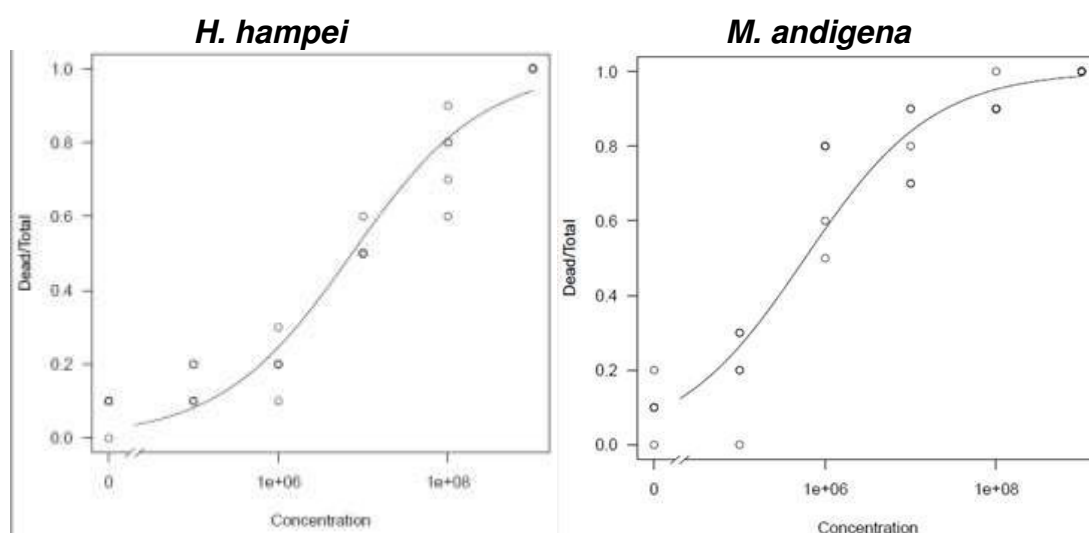


Figura 12. Mortalidad acumulada de *H. hampei* y *M. andigena* vs la contracción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio.

Comparando el porcentaje obtenido (100%) en el presente ensayo, se observa que fue superior al valor alcanzado en el laboratorio por Cruz, Gaitán & Góngora (2006), quienes registraron un porcentaje de mortalidad en la broca del 90% con la utilización de mezcla de *B. bassiana* de alta virulencia (activadas) a los 10 días post inoculación.

Con respecto a la virulencia de la mezcla de cepas del CENICAFÉ (2013) (Bb9001, Bb9024 y Bb9119) y *M. anisopliae* 9236 sobre brocas recién emergidas, observaron que a una concentración de 1×10^6 conidios/mL, todos los tratamientos causaron mortalidad de la plaga superior al 88% en un período de 4,54 a 6,36 días, tiempo a partir del cual comenzó el desarrollo micelial de los hongos sobre los individuos. Comparando con la mortalidad de *H. hampei* obtenida en este estudio (20%) a la misma concentración, se observa que este porcentaje fue mínimo, lo que implica que la mezcla de las cepas de CENICAFÉ ejerció un efecto sinérgico sobre el control del insecto plaga del café.

4.1.8.2.2.1. Análisis de varianza de la mortalidad entre la *H. hampei* y *M. andigena* por la *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Los datos del porcentaje para mortalidad de los insectos plaga fueron comparados con el testigo. Se aplicó ANOVA y se observa, dos P-valores igual a 0,0000, inferiores $p \leq 0,05$. En consecuencia, se confirma que hubo diferencias estadísticas significativas de la virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre los insectos plaga *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena*, respectivamente, a nivel de laboratorio (ver Cuadro 44).

Cuadro 44. Análisis de varianza de la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* entre *H. hampei* y *M. andigena*.

Cepas/Código	Fuente		Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
<i>B. bassiana</i> COMPBb01	Entre	e	35706,7	5	7141,33	164,80	0,0000
	Intra		1040,0	24	43,3333		
grupos							
Total corregido			36746,7	29			
<i>M. anisopliae</i> COMPMa01	Entre	e	37936,7	5	7587,33	31,61	0,0000
	Intra		5760,0	24	240,0		
grupos							
Total corregido			43696,7	29			

.... 4.1.8.3. Determinación de la concentración letal (50) y tiempo letal (50) de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos sobre *H. hampei* y *M. andigena*.

Se realizó para evaluar la virulencia de los hongos nativos y relacionó la variable dependiente Y (Mortalidad) con la variable predictora X (Logaritmo₁₀ de la concentración). Se valoraron cinco concentraciones (1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 conidios/mL), inoculados a los insectos frente a un tratamiento testigo durante los diez días a nivel de laboratorio.

Para la evaluación de la virulencia de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* nativos a nivel de laboratorio, se aplicó el análisis Probit mediante el cálculo de los percentiles 50, obtenidos de los modelos ajustados al cual éstos alcanzaron porcentajes seguros. Conjuntamente, se exponen los límites de confianza superior e inferior de los percentiles en mención (ver Cuadros 45-48).

De los cuadros antes mencionados, se elaboró una síntesis del Logaritmo₁₀ de la concentración letal (50) y el tiempo letal (50) de los aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* (COMPb01) y *Metarhizium anisopliae* (COMPMa01), expresados en unidades infectivas (conidios/mL) sobre los insectos plaga del cultivo de café *Hypothenemus hampei* y el salivazo de la caña de azúcar *Mahanarva andigena*. Además, los límites superior e inferior (ver Cuadro 47).

Cuadro 45. Porcentaje, percentil 50 (CL₅₀) y límite de confianza inferior y superior de *B. bassiana* sobre el *Hypothenemus hampei*.

Porcentaje	Percentil (Log 10)	Inferior 95,0% Límite Confianza	Superior 95,0% Límite Confianza
0,1	-1,86358	-2,87458	-1,03486
0,5	-0,209539	-1,03863	0,471192
1,0	0,592638	-0,148837	1,2022
2,0	1,46914	0,822699	2,00164
3,0	2,02525	1,43857	2,50939
4,0	2,44359	1,90149	2,89172
5,0	2,78387	2,27774	3,20302
6,0	3,07351	2,59772	3,46825
7,0	3,32747	2,87805	3,70104
8,0	3,55485	3,12883	3,9097
9,0	3,76165	3,35668	4,09969
10,0	3,95201	3,56621	4,27478
15,0	4,74015	4,43077	5,00267
20,0	5,36654	5,11253	5,58653
25,0	5,90393	5,69071	6,09414
30,0	6,38652	6,2014	6,55852
35,0	6,83371	6,66431	6,99916
40,0	7,25805	7,09248	7,42838
45,0	7,6686	7,49652	7,85387
50,0	8,07263	7,88589	8,28083
55,0	8,47665	8,26916	8,71389
60,0	8,88721	8,65424	9,15834
65,0	9,31155	9,04905	9,62091
70,0	9,75874	9,46272	10,1108
75,0	10,2413	9,90724	10,6413
80,0	10,7787	10,4006	11,2337
85,0	11,4051	10,9743	11,9257
90,0	12,1932	11,6947	12,7978
91,0	12,3836	11,8685	13,0086
92,0	12,5904	12,0572	13,2377
93,0	12,8178	12,2647	13,4896
94,0	13,0717	12,4964	13,7711
95,0	13,3614	12,7605	14,0922
96,0	13,7017	13,0707	14,4696
97,0	14,12	13,4519	14,9336
98,0	14,6761	13,9584	15,5507
99,0	15,5526	14,7565	16,5236
99,5	16,3548	15,4866	17,4143
99,9	18,0088	16,9914	19,2515

Cuadro 46. Porcentaje, percentil 50 (TL₅₀) y límite de confianza inferior y superior de *B. bassiana* sobre el *Hypothenemus hampei*

Porcentaje	Percentil (Log 10)	Inferior 95,0% Límite Confianza	Superior 95,0% Límite Confianza
0,1	13,9541	-16,9636	-11,6342
0,5	-10,0621	-12,4928	-8,18574
1,0	-8,17449	-10,3257	-6,5121
2,0	-6,11203	-7,95935	-4,68194
3,0	-4,80347	-6,45911	-3,51962
4,0	-3,8191	-5,33138	-2,64441
5,0	-3,01838	-4,41476	-1,9318
6,0	-2,33685	-3,63519	-1,32463
7,0	-1,73928	-2,95226	-0,791665
8,0	-1,20422	-2,34135	-0,313887
9,0	-0,717612	-1,78631	0,121204
10,0	-0,269685	-1,27598	0,522283
15,0	1,58486	0,828122	2,19166
20,0	3,05879	2,48181	3,53702
25,0	4,32329	3,87209	4,71966
30,0	5,45885	5,07828	5,82402
35,0	6,51111	6,14471	6,89867
40,0	7,50961	7,11184	7,96322
45,0	8,47568	8,0178	9,02293
50,0	9,42636	8,89176	10,0834
55,0	10,3771	9,75524	11,1543
60,0	11,3431	10,6261	12,2491
65,0	12,3416	11,5217	13,3852
70,0	13,3939	12,4623	14,5856
75,0	14,5294	13,4749	15,8836
80,0	15,7939	14,6004	17,331
85,0	17,2679	15,9104	19,0201
90,0	19,1224	17,5567	21,1473
91,0	19,5703	17,9541	21,6613
92,0	20,057	18,3857	22,2198
93,0	20,592	18,8602	22,834
94,0	21,1896	19,3901	23,52
95,0	21,8711	19,9942	24,3026
96,0	20,7039	22,6718	25,2221
97,0	23,6562	21,5762	26,3528
98,0	24,9648	22,7355	27,856
99,0	27,0272	24,5622	30,2258
99,5	28,9148	26,2336	32,3951
99,9	32,8068	29,6792	36,8689

Cuadro 47. Porcentaje, percentil 50 (CL₅₀) y límite de confianza inferior y superior de *M. anisopliae* sobre el *H. andigena*.

Porcentaje	Percentil (Log 10)	Límite Confianza Inferior 95,0%	Límite Confianza Superior 95,0%
0,1	-2,89298	-3,84099	-2,0959
0,5	-1,25297	-2,04572	-0,585549
1,0	-0,457593	-1,17552	0,147409
2,0	0,411475	-0,225206	0,948795
3,0	0,962868	0,377355	1,45763
4,0	1,37766	0,830383	1,84065
5,0	1,71506	1,19869	2,15242
6,0	2,00224	1,51201	2,41794
7,0	2,25404	1,78658	2,6509
8,0	2,4795	2,03229	2,85963
9,0	2,68455	2,25563	3,04958
10,0	2,87329	2,4611	3,22455
15,0	3,65475	3,31018	3,95057
20,0	4,27583	3,98235	4,53025
25,0	4,80866	4,55599	5,03059
30,0	5,28715	5,06745	5,48359
35,0	5,73055	5,5368	5,90796
40,0	6,15129	5,9764	6,31641
45,0	6,55837	6,39482	6,7185
50,0	6,95897	6,79891	7,12184
55,0	7,35956	7,19536	7,53284
60,0	7,76664	7,59132	7,95738
65,0	8,18738	7,99482	8,40193
70,0	8,63078	8,41543	8,87504
75,0	9,10928	8,86564	9,3893
80,0	9,6421	9,36391	9,965
85,0	10,2632	9,94204	10,6387
90,0	11,0446	10,6669	11,489
91,0	11,2334	10,8416	11,6947
92,0	11,4384	11,0314	11,9182
93,0	11,6639	11,2399	12,1641
94,0	11,9157	11,4727	12,4389
95,0	12,2029	11,738	12,7524
96,0	12,5403	12,0496	13,1209
97,0	12,9551	12,4324	13,5741
98,0	13,5065	12,941	14,1769
99,0	14,3755	13,7422	15,1275
99,5	15,1709	14,475	15,9978
99,9	16,8109	15,9851	17,7933

Cuadro 48. Porcentaje, percentil 50 (TL₅₀) y límite de confianza inferior y superior de *M. anisoplie* sobre el *Mahanarva andigena*.

Porcentaje	Percentil (Log 10)	Inferior 95,0% Límite Confianza	Superior 95,0% Límite Confianza
0,1	-215599	-34,9715	-14,7788
0,5	-3,28828	-8,30805	-0,730373
1,0	-2,17858	-6,65765	0,112045
2,0	-0,966073	-4,85714	1,03531
3,0	-0,196777	-3,71692	1,62323
4,0	0,381933	-2,86068	2,06701
5,0	0,85267	-2,16543	2,42921
6,0	1,25334	-1,57473	2,73858
7,0	1,60465	-1,05778	3,01081
8,0	1,91921	-0,595843	3,2555
9,0	2,20529	-0,176629	3,47892
10,0	2,46862	0,208373	3,68548
15,0	3,5589	1,78974	4,5533
20,0	4,42542	3,02266	5,26692
25,0	5,16881	4,04864	5,91091
30,0	5,8364	4,92637	6,53285
35,0	6,45502	5,683	7,16589
40,0	7,04204	6,33739	7,83017
45,0	7,60998	6,91238	8,531
50,0	6,58974	5,65514	7,7781
55,0	8,7278	7,92442	10,03
60,0	9,29574	8,40218	10,8281
65,0	9,88276	8,88159	11,6673
70,0	10,5014	9,37638	12,5622
75,0	11,169	9,90233	13,5359
80,0	11,9124	10,4814	14,6268
85,0	12,7789	11,1506	15,9042
90,0	13,8692	11,9867	17,5173
91,0	14,1325	12,1879	17,9076
92,0	14,4186	12,4063	18,3319
93,0	14,7331	12,6461	18,7987
94,0	15,0844	12,9137	19,3203
95,0	15,4851	13,2185	19,9156
96,0	15,9558	13,5761	20,6154
97,0	16,5346	14,0154	21,4762
98,0	17,3039	14,5985	22,6212
99,0	18,5164	15,5162	24,4272
99,5	19,6261	16,355	26,0812
99,9	34,7394	27,4591	49,1451

Cuadro 49. Concentración letal (50) y tiempo letal (50) de los aislamientos nativos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre *H. hampei* y *M. andigena*.

Aislamiento Código cepa	Logaritmo de la concentración (Conidios/mL)			Tiempo (días)		
	CL ₅₀	*LCI al 95%	**LCS al 95%	TL ₅₀	LCI al 95%	LCS al 95%
COMPBb01	8,07263	7,88589	8,28083	9,42636	8,89176	10,0834
COMPMa01	6,95897	6,79891	7,12184	6,58974	5,65514	7,7781

*LCI = Límite confianza inferior. **LCS = Límite confianza superior.

La virulencia de *Beauveria bassiana*, cepa COMPBb01 nativa sobre las brocas del café *Mahanarva andigena* de 10 días de emergidas, se observó que a una CL₅₀ de 1.0×10^8 conidios/mL tras la inoculación ocasionó la muerte al 50 % de los insectos en un TL₅₀ estimado de 9.4 días, tiempo a partir del cual empezó el desarrollo micelial de los hongos sobre los individuos. Los valores de mortalidad fueron muy análogos entre sí para las cinco repeticiones del bioensayo y diferentes con respecto al testigo (Cuadro 49).

Resultados que difieren de los obtenidos por Suarez y Mejía (2012), quienes reportaron una virulencia de *B. bassiana* sobre *H. hampei* con una CL₅₀ de 1.0×10^9 conidios/mL y un TL₅₀ de 7 días. Esto se debe a la inoculación de una suspensión de conidios superior a la utilizada en la presente investigación y posiblemente a la diferencia existente de la virulencia entre los aislamientos de la misma especie.

De acuerdo con Tonada y Kaya (1993). La virulencia de las cepas de hongos entomopatógenos es una característica relevante en la selección de los aislamientos para el biocontrol de insectos plaga como las brocas del café, debido a que se presentan diferencias importantes en la virulencia entre aislamientos de la misma especie.

El análisis de Probit estableció que con una CL₅₀ de $1,0 \times 10^7$ conidios/mL post inoculación de *Metarhizium anisopliae*, cepa COMPMa01 nativa sobre los salivazos de la caña de azúcar del tercer instar causó la muerte al 50 % de los insectos plaga en un TL₅₀ estimado de 6.5 días (Cuadro 49). Confrontando

éstos resultados con los alcanzados por Calle (2013), quien determinó que la inoculación de *Metarhizium sp.*, al salivazo de la caña a una de concentración de 3.57×10^6 conidios/mL eliminó al 50 % del insecto en un TL_{50} de 4.01 días. Esto significa que éste aislamiento fue más virulento, pero se desconoce la especie del hongo entomopatógeno *Metarhizium*.

Con la evaluación de esta variable, se estableció que a medida que transcurre el tiempo post inoculación se incrementa la mortalidad de los insectos, por efecto de las toxinas (Bassiatina, destruxinas y otras) y las enzimas (hidrolíticas, proteasa y lipasas) propias de los hongos entomopatógenos investigados (Varela, 2016).

4.19. Verificación de hipótesis

Para la verificación de las hipótesis, se utilizaron los resultados obtenidos de la producción *in vitro* y masa; además, de la determinación de las características fisiológicas y biológicas (virulencia) de la presente investigación.

4.19.1. Verificación de la hipótesis general.

Para su verificación, se utilizó los resultados de la producción en masa de *B. bassiana* y *M. anisopliae* cultivados en arroz y maíz con la adición de suplementos nutritivos.

4.19.1.1. Planteamiento de las hipótesis. $H_0 = H_1$; $H_0 \neq H_1$

Hipótesis alternativa (H_0): El aislamiento de cepas nativas y la adición de suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) “no” generan incremento significativo en la producción y

virulencia *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena* en el laboratorio.

Hipótesis alternativa (H_1): El aislamiento de cepas nativas y la adición de suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) “sí” generan incremento significativo en la producción y virulencia *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena* en el laboratorio.

4.19.1.2. Comprobación de la hipótesis general. Se comprobó con el análisis de varianza de la producción en masa, existió diferencias estadísticas significativas a un nivel de confianza de 95% entre los sustratos sólidos (0,0009), suplementos nutritivos (0,0000), las interacciones AB (0,0080) y BC (0,0363). Como se observa, éstos valores fueron inferiores a $p \leq 0,05$. Lo que significa que la adición de los suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L), generó un incremento significativo en la producción y virulencia *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena* en el laboratorio. Del análisis anterior, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa (ver Cuadro 30).

4.19.2. Verificación de las hipótesis específicas.

Para la verificación, se tomaron los resultados de las características fisiológicas y biológicas (virulencia) de los hongos entomopatógenos experimentadas.

4.19.2.1. Verificación de la hipótesis específica 1. Para su comprobación se evaluó la dimensión de los conidios de los hongos entomopatógenos, expresados en micrómetros.

4.19.2.1.1. **Planeamiento de la hipótesis.**

H₀: El aislamiento de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a partir diferentes fuentes y la determinación de sus características morfo fisiológicas “no” confirma su género y especies.

H₁: El aislamiento de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* a partir diferentes fuentes y la determinación de sus características morfo fisiológicas “sí” confirma su género y especies.

4.19.2.1.2. Comprobación de la hipótesis. Del ANOVA se deduce que entre el factor dimensión de conidios y hongos entomopatógenos (interacción AB), existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de 95%, con un p-valor de 0,034. Por lo que, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa (ver Cuadro 19).

4.19.2.2. Verificación de la hipótesis específica 2. Se evaluó el crecimiento radial micelial de las colonias de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, en el medio de cultivo papa dextrosa agar modificada, derivadas de la producción en masa en los sustratos nutritivos.

4.19.2.2.1. **Planeamiento de la hipótesis.**

H₀: La valoración de parámetros de producción de conidios “*in vitro*” con la adición de suplementos nutritivos al arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) “no” generan incremento significativo en la producción de *Beauveria. Bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el laboratorio.

H₁: La valoración de parámetros de producción masiva de conidios con la adición de suplementos nutritivos al arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) “sí” generan incremento significativo en la producción de *Beauveria. Bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el laboratorio.

4.19.2.2.2. Comprobación de la hipótesis. Del ANOVA, se observó que 2 p-valores fueron iguales a 0,0000 (tiempo en días y en la interacción AB), mismos que son inferiores a $P \leq 0.05$, por consiguientes existieron diferencias estadísticas significativas entre el crecimiento radial micelial de las colonias de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y los días de incubación a un nivel de confianza de 95,0% (ver Cuadro 36). En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

4.19.2.3. Verificación de la hipótesis específica 3. Se determinó mediante el análisis de varianza de la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* entre *H. hampei* y *M. andigena*.

4.19.2.3.1. Planeamiento de la hipótesis.

H₀: La aplicación de un bioensayo utilizando los aislamientos nativos *Beauveria. Bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*. Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi), “no” permite la valoración de la patogenicidad y virulencia en el laboratorio.

H₁: La aplicación de un bioensayo utilizando los aislamientos nativos *Beauveria. Bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei*. Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi), “sí” permite la valoración de la patogenicidad y virulencia en el laboratorio.

4.19.2.3.2. Comprobación de la hipótesis. En el Cuadro 44 se observa, dos P-valores 0,0000, inferiores a $p \leq 0,005$, se confirma que hubo diferencias estadísticas significativas para la virulencia *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre los insectos plaga *Hypothenemus hampei* y *Mahanarva andigena*, respectivamente, a nivel de laboratorio. Por consiguiente, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

Como parte complementaria de la comprobación de la hipótesis específica 3, se presenta la mortalidad acumulada del insectos plaga *Hypothenemus hampei* vs la concentración de *Beauveria bassiana* durante los 10 días que duró el bioensayo a nivel de laboratorio (ver Figura 13).

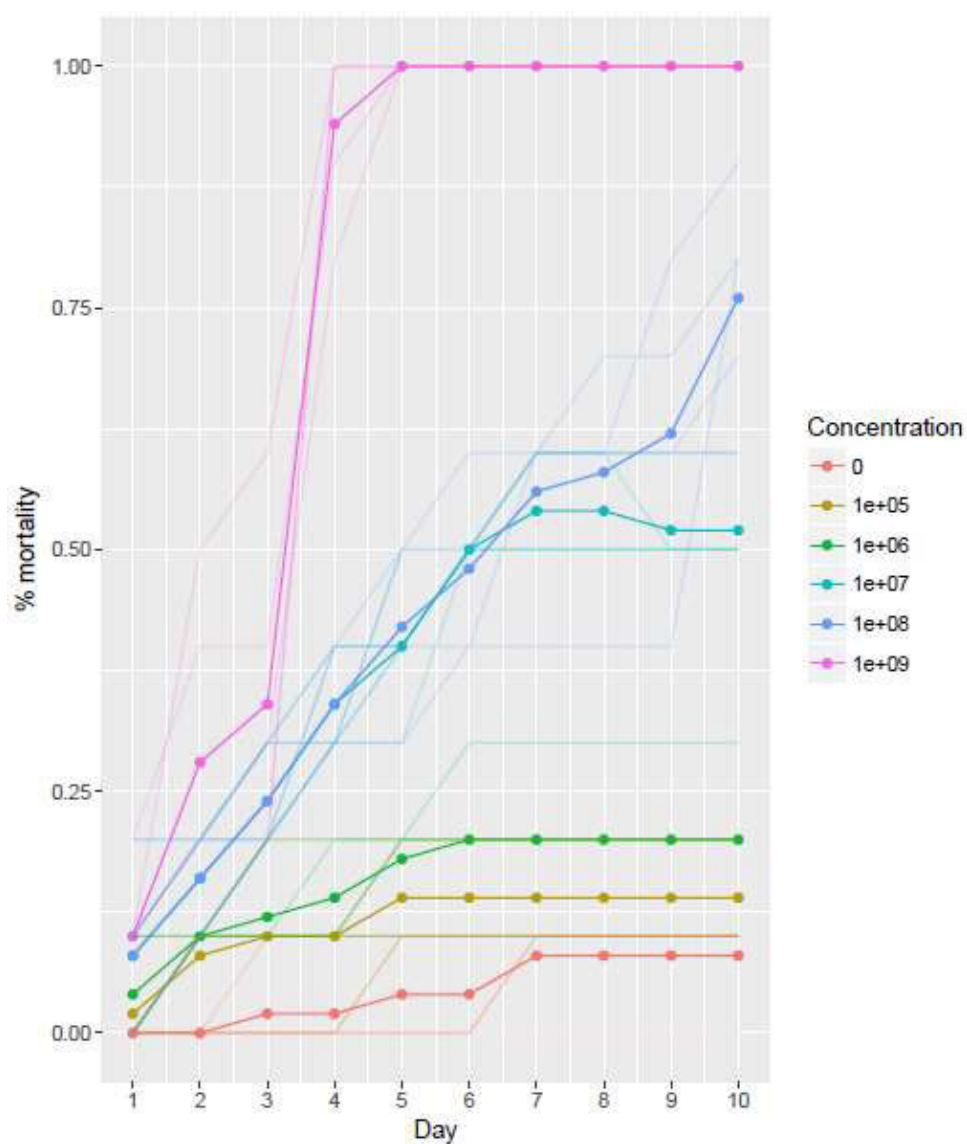


Figura 13. Porcentaje de mortalidad acumulada de *H. hampei* y logaritmo de la concentración vs el tiempo (días) de la exposición a *B. bassiana* a nivel de laboratorio.

Comprobación de la hipótesis específica 3, para la mortalidad acumulada del insectos plaga *Mahanarva andigena* vs la concentración de *Metarhizium anisopliae* durante los 10 días que duró el bioensayo a nivel de laboratorio (ver Figura 14).

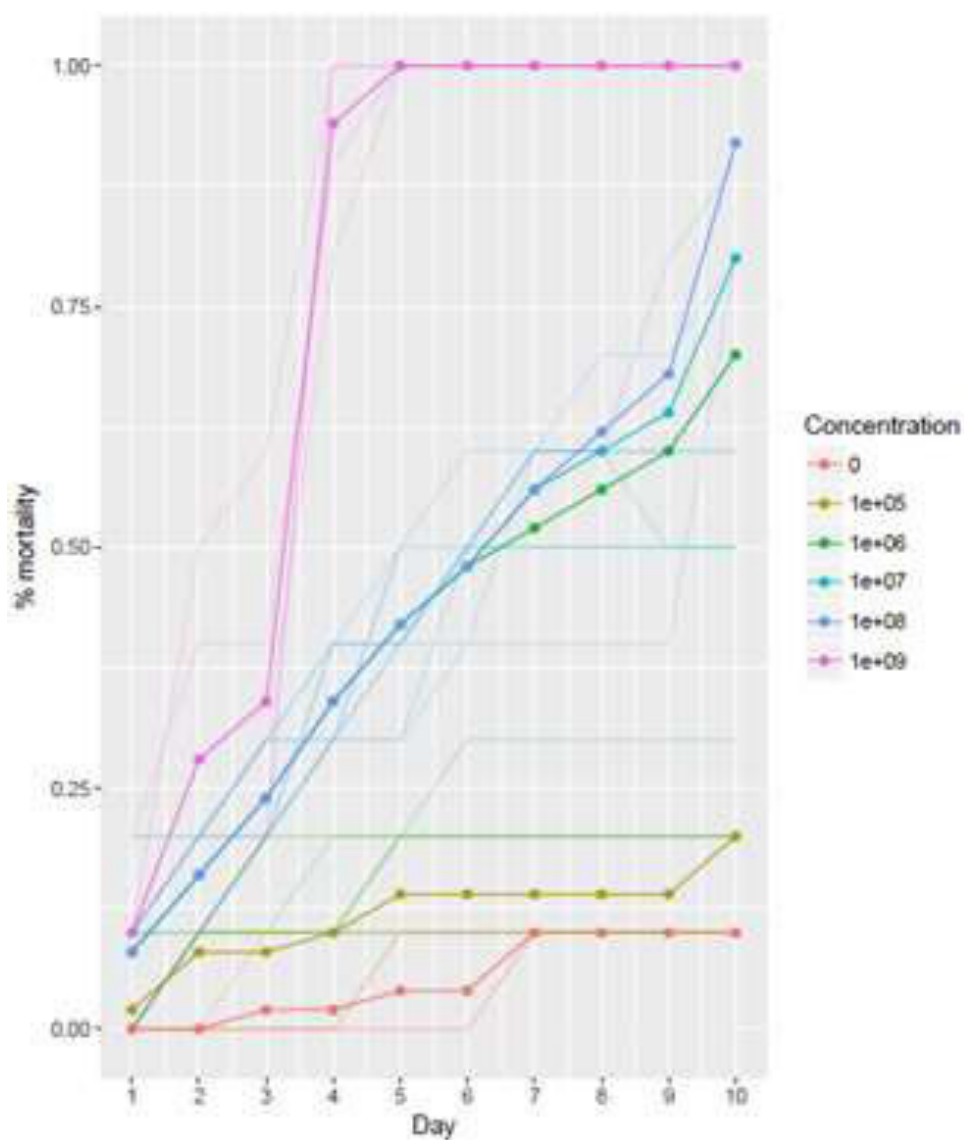


Figura 14. Porcentaje de mortalidad acumulada de *M. andigena* y logaritmo de la concentración vs el tiempo (días) de la exposición a *M. anisopliae* a nivel de laboratorio.

CONCLUSIONES.

- Se confirmó que los aislamientos de las cepas nativas *Beauveria bassiana* procedentes de la broca del fruto de café (*Hypothenemus hampei*) y *Metarhizium anisopliae* de salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*), originarias de “Los Ángeles”, Ventanas, los Ríos (Ecuador), a partir de criterios morfológicos, fisiológicos y biológicos pertenecen a estas especies.
- Se determinó los parámetros de producción masiva de conidios en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* nativos, con la adición de suplementos nutritivos como fuentes de carbono y nitrógeno al sustrato sólido arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L) para la generación e incremento significativo de conidios en el laboratorio.
- Se ratificó que el sustrato sólido que dio la mejor respuesta para el desarrollo en masa de conidios en los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* nativos, por el método de fermentación en estado sólido fue el maíz quebrado con la adición de los suplementos nutritivos melaza (desecho industrial), leche en polvo, concentración 1 (2.5 g y 0,25 g), respectivamente, con un rendimiento promedio de $2,05 \times 10^9$ Conidios/g en la cepa COMPBb01 y $2,50 \times 10^9$ Conidios/g para COMPMa01.
- Se comprobó que todos los aislamientos nativos de la *Beauveria bassiana* (*Bálsamo*) Vuillemin, fueron patógenos para la broca del fruto de café (*Hypothenemus hampei*. Ferrari), en el rango porcentual del 60% al 100%, especialmente la cepa COMPBb01. En el *Metarhizium anisopliae* (*Metschnikoff*) Sorokin nativo, cepa COMPMa01, también se evidenció su patogenicidad sobre las ninfas del salivazo de la caña de azúcar (*Mahanarva andigena*. Jacobi), causando la muerte entre el 94% al 100% del insecto plaga a nivel de laboratorio.

- Se confirmó que el valor de la concentración letal 50 (CL₅₀) de la cepa nativa COMPBb01 fue $1,0 \times 10^8$ conidios/mL con un tiempo letal 50 (TL₅₀) de 9,4 días. En COMPMa01 la CL₅₀ fue $1,0 \times 10^7$ conidios/mL y el TL₅₀ de 6,5 días. Es decir, que la población de insectos de la broca del café (*H. hampei*) y las ninfas de la caña de azúcar *M. andigena*, demandaron la concentración y tiempo letal 50 para que ser eliminados en el laboratorio.
- Se contribuyó con una tecnología limpia y amigable con el ambiente al generar unidades infectivas (conidios) para los futuros bioformulados de insecticidas microbiológicos que eliminen y/o reduzcan las poblaciones de los insectos de plagas agrícolas como una alternativa sostenible para la no utilización de plaguicidas químicos, que causan detrimento en la salud humana, animal y todos los ecosistemas del planeta Tierra.

RECOMENDACIONES.

- Realizar evaluaciones de la caracterización molecular de las cepas nativas de *Beauveria Bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para ratificar su especie.
- La producción masiva de conidios de *Beauveria Bassiana* y *Metarhizium anisopliae* nativos a escala semi industrial con la adición de suplementos nutritivos melaza (aprovechando un desecho industrial), leche en polvo a los sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa*. L.) y maíz (*Zea mays*. L), con la finalidad de generar un incremento significativo en la producción, que sea asequibles, económicos y fáciles de manejar.
- Efectuar estudios similares que contemplen la utilización de residuos agroindustriales y materiales inertes disponibles para la producción en masa de hongos entomopatógenos.
- Comprobar la efectividad de conidios de los hongos entomopatógenos nativos *Beauveria bassiana*, cepa COMPBb01 y la COMPMa01 de *Metarhizium anisopliae* para la elaboración de bioformulados y su aplicación para el control biológico de insectos plaga de importancia económica a nivel de campo.
- Finalmente, seguir aislando hongos entomopatógenos nativos para preservar la bioseguridad de los insectos no objetivos (insectos beneficiosos) en sus hábitats naturales y la creación de una micoteca en la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias y el Ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D.L. and Gibson, N.L. (1998) New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. *Australian Systematic Botany* 11, 53–72..
- Ames, T. & Cañedo, V. (2004). En C. I. (CIP)., *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima-Perú: Publicaciones del bCIP.Pp. 11-12.35.
- Asamblea Constituyente. (2008). Constitución Política del Ecuador., (pág. 5).
- Arias E., (2007). Aislamiento y patogenicidad del hongo nativo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Controlador biológico de la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari).
- Alves, R. T., & Carvalho, G. S. (2014). Primeiro registro das espécies de cigarrinhas-daraizda cana-de-açúcar *Mahanarva spectabilis* (Distant) e *Mahanarva liturata* (Le Peletier & Serville) atacando canaviais na região de Goianésia (GO). *Brasil.Arq. Inst. Biol.*, 81(1), 83-85.
- Ayala, M. A., Montesinos, R., & Berlanga, A. (2012). Obtención de cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos. TECOMÁN: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. Ficha Técnica CB-27, p 4.
- Bautista, G. et al (2012). Genetic characterization of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolates from sugarcane field and their pathogenicity against *Aeneolamiapostica* (Walker) (Hemiptera. Cercopidae). Pp.: 217-229).
- Balachander, M., Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O., & Bai, N. S. (2012). Virulence and mycotoxic effects of *Metarhizium anisopliae* on *Mahogany shoot borer*, *Hypsipyla robusta* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Forestry Research*, 23(4), 651-659.
- Ballesteros, M. (2015). Factores Nutricionales que Afectan la Actividad Insecticida *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra *Periplaneta americana* L. y la Respuesta Inmune del Insecto.

- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. (4ed). Minneapolis, US: Burgess Publishing Company.
- Bartlell, M. C., & Jaronsky, S. T. (1984). Mass production of entomogenous fungi for biology control of insects. In M. N. Burge (Ed.). *Fungi in Biological Systems* (pp. 61-85). Manchester. UK: Manchester University Press.
- Benavides M., P.; Góngora, C. E.; Bustillo P., A. E. (2012). IPM Program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia, Insecticides - Advances in Integrated Pest Management, Dr. Farzana Perveen (Ed.). ISBN: 978-953-307-780-2.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A., Humber, R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycology* 101, 512-530.
- Bolaños, F. (1990). El impacto biológico: Problema ambiental contemporáneo. UNAM. Pp: 1-3.
- Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V & Eilenberg, J. (2014). Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annu Rev Entomol* 59, 467–485. Doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162054.
- Bhoosreddy, G. L. (2014). Use of low cost substrates in Mass production of *Metarhizium anisopliae* and evaluation of its insecticidal potential as mycopesticide. *International Journal of Advanced Research*, 2(8), 62-65.
- Bustillo, A. (2006). Pruebas microbiológicas y físico-químicas para el control de calidad de hongos entomopatógenos. Conference paper. ReserchaGate.
- Bustillo P., A. E. (2008^a). Aspectos sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia. En: Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchiná (Colombia), Cenicafé. P. 466.
- Bustillo, A. (2008^b). Como implementar un programa de manejo integrado de plagas. pp. 94-109. En: Bustillo P., A. E. (Ed.). Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Cenicafé, Chinchiná, Colombia. P. 466.
- Bustillo, P., A. E. (2004) ¿Cómo participa el hongo *B. bassiana* en el manejo integrada de la broca del café? Brocarta. Cenicafé (Colombia). 53 (1): 39-48.

- Bustillo, A *et al* (1998). manejo integrada de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, Cenicafé. P: 134.
- Bustillo *et al.* (2006). A review of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in Colombia. Revista Colombiana de Entomología; (Consultado 09 de marzo 2017). 32(2):101–116. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttexto.
- Butt, T.M., Wang, C.-S., Shah, F.A. and Hall, R. (2006) Degeneration of entomogenous fungi. In An Ecological and Societal Approach to Biological Control ed. Eilenberg, J. and Hokkanen, H.M.T. pp. 213 Dordrecht, the Netherlands:Kluwer Academic Press.
- Brady, B.L.K. (1979). CMI Descr. Pathog. Fungi Bact.603. Recuperado el 22 de septiembre del 2016. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>.
- Calles, G. (2013). Prospección de Insectos Plaga y sus Controladores Biológicos en el Cultivo de Caña Panelera (*Saccharum Officinarum*). Pacto, Pichincha.
- Camilo JE, Olivares FF, Jiménez HA. (2003). Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. Agronomía mesoamericana. 14(1):59–64. <http://www.mag.go.pdf>.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Medios de Cultivo de Laboratorio. En *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. (págs. 18-22.). Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). Recuperado el 11 de 01 de 2015.P.43-44.
- Casida, J.E., Quistad, G.B. (1998). Golden age of insecticide research: Past, present, or future Annual Review of Entomology 43, 1-16.
- Castillo, S. (2006). Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia spp.*, y *Prosapia spp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén. Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica, Guatemala. Centro Agrónomo Tropical de investigación y enseñanza. Turrialba, Costa Rica. p. 4-11. Consultado 05 de junio del 2017. Disponible: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.Pdf>.
- Castillo, C. *et al* (2014). Morphological Characterisation of *Beauveria bassiana* Isolates from Different Insects in Trujillo State, Venezuela. Revista Academia - ISSN 1690-3226-Julio-Septiembre XI (23) 2012. Pp. 275.

- Castrejón-Antonio J.E., Iracheta-Cárdenas, M.M., Núñez-Mejía, G., Tamayo-Mejía, F., Ocampo-Hernández J.A., Gómez-Flores, R., Tamez-Guerra, P. (2012). Assessment of cuticle-degrading enzymes production by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin in liquid media to improve the *Epilachna varivestis* (Mulsant) biocontrol. Biotechnology SUMMIT-2012. International Foundation for Biotechnology
- Castro, R (2015). Control de calidad en los procesos de control de calidad de los hongos entomopatógenos y del parasitoide *Cotesia flavipes* en Costa Rica. Pp. 1-4, 7-13.
- Claro, O.E., Ramos, J.J., & Pérez, A.C (2006). Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos micopíricos con potencial para el control de especies de insectos plagas. Fitosanidad, 10(4). Pp: 265-272.
- Czaja, K., Góralczyk, K., óń k P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., Ł z w kM., Ludwicki, J.K. (2015). Biopesticides-towards increased consumer safety in the European Union. Pest Management Science 71, 3-6.
- Cetino, J. (2008). Manejo de potreros y actividades agropecuarias en la comunidad Santa Rosita, en el municipio de Dolores, departamento de Petén. Universidad de San Carlos de Guatemala. P. 128. Consultado 05 del junio del 2017. Disponible: <http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/.pdf>
- Centro de Investigación de la caña de azúcar de Colombia (CENICAÑA). (2011). Informe final técnico proyecto: Utilización de hongos entomopatógenos para el control del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemíptera: Cercopidae). Colombia.
- Centro de Investigación de la caña de Azúcar del Ecuador (CINCAE). (2002). *Entomopatógenos*. Cuenca.
- CINCAE. (2012). Proyecto de investigación, cuantificación de las pérdidas de sacarosa en la caña de azúcar. Consultado 05 junio del 2017. Disponible en: <http://www.cincae.org/entomologia.htm>.
- (CINCAE) Centro de Investigación de la caña de azúcar del Ecuador (2013). Recuperado el 07 de octubre del 2016. Disponible en: <http://cincae.org/areas-de-investigacion/manejo-de-plagas/salivazo/>.
- (CENICAFÉ) Centro de Investigación del café (2010).

- Constantino, L.M., Navarro, L., Berrio, A., Acevedo, F., Rubio, D., & Benavides, P. (2011). Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Rev. Colomb. Entomol. Vol.37 N°.2 Bogotá July/Dec. 2011.
- Constitución República del Ecuador. (2008). Constitución Política del Ecuador., (pág. 5).
- Cuarán, V. L. (2012). Respuesta de variedades de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) al ataque de las ninfas del salivazo *Aeneolamia varia* (F.) (Hemiptera: Cercopidae). (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Crissman, C. (2009) "Uso de pesticidas y salud de los trabajadores agrícolas en la producción de papa en el Ecuador". Proyecto SICA, (Ecuador). Pp.1-8. [Consulta: 07 de marzo 2017-03-07. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec/cadenas/papa/fungicidas.html>.
- Cruz, I. (2014). Control microbial. UNAN-OEA.
- Charnley, A.K., Collins, S.A. (2007). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: Kubicek, C.P. y Druzhinina, I.S. (Eds.) Environment and microbial relationships. 2nd Edition, The Mycota IV. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 159-185.
- Chávez J. (2016). Entrevista personal. Catedrático de Posgrado de la Universidad Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
- Dalla, J., Andrés, P., Teixeira, L. B., Messias, C., Azevedo, J & Magalhães, P. (2008). Bioassay assessment of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycota: dae). Hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (Signoret) Hemiptera: Cicadelli. Braziliam Journal of Microbiology, 12-132.
- Damas G. (2012). Aislamiento y efectividad de *B. bassiana* (Blasm) Villemin para el control biológico de la cucaracha urbana *P. americana*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Daxl, R., Kayserling, N., Klein, C., Link, R., & Hermann, W. (1994). *El manejo integrado de plagas*. Ecuador, Quito, Ecuador: Monserrat.
- Dayakar, S., & Subbarao, Y. (2011). Influence of addition of host larval extract to medium on the virulence of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

- and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin against *Spodoptera litura* Fab. Journal of Biopesticides, 4 (1), 91-95.
- Delgado, M., Andrés, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente*, 77-90.
- Delgado, N. (2014). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Zoología Agrícola. Pp.1-6.
- (De la Cruz, W & Cajilima A. (2016). Control biológico del salivazo (*Mahanarva andigena*) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con *Metarhizium* sp. (Fungi: Ascomycota: Clavicipitaceae). Pp. 18.
- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (2007). Compendium of soil fungi. IHWVerlag Eching. USA. Second edition.
- Domsch, M., Romero, M., Rivero M., & Barroso, F. (2007). Presencia natural de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrido) en Cuba. Rev. Iberoam. Micol., 21, 42-43.
- Dulce, A. (29 de Noviembre de 2011). *Beauveria bassiana*.Glosario. Obtenido de Glosario: http://B.bassiana.blogspot.com/2011_11_01_archive.html.
- Elósegui, o., Jiménez, J., Carr, A. (2006). Fitosanidad. Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga., Vol. 10, núm. 4, diciembre. Pp. 265 – 272.
- Escamilla, Y., Serrano, M.J y Cuapio, A (2016). Agricultural Pest Control With Entomopathogenic Fungi. Revista Científica Tecnológica Multidisciplinaria del Tecnológico de Estudios Superiores del Oriente del Estado de México.Fargues, J.; Maniania, N. Fajardo, E. &. (2007). *Evaluación de Melaza de Caña como Sustrato para la Producción de Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de Grado).
- Eyal, M. D., Mabut, A., Fishbein, K. L., Walter, J.F., Osbourne, L. S., & Landa, Z. (1994). Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 Strain, Which Produces a Red Pigment for Microbial Control. Journal Applied Biochemistry and Biochemistry, Vol. 44, Nom. 1. Pp 65-80.
- Fanti, A. L., & Alves, L. F. (2013). Isolados de fungos entomopatogênicos visando ao controle da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) Klug (Coleoptera; Cerambycidae). Semina: Ciencias Agrarias, 34(4), 1467-1478.

- Faria, M. & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Micoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. . En *Biologic Control*. (págs. 43, 237-256).
- Fargues, J., N. K. Maniania, J. C. Delmas, & N. Smits. (1992). Influence de température sur la croissance in vitro d'hyphomycètes entomopathogènes (en línea), *Agronomie* 12: 557–564p. Consultado el 30 mayo 2017. Disponible en: http://www.agronomy-journal.org/articles/agro/pdf/1992/07/Agronomie_0249-5627_1992.pdf
- Fernandes, E. K., Keyser, C. A., Chong, J. P., Rangel, D. E., Miller, M. P., & Roberts, D. W. (2010). Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 115–128.
- Fernández, O., & Vega, L. (2006). Temas interesantes acerca del control biológico de plagas. 2 ed. Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. P. 240.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2012). El Pacto Mundial contra plagas de las plantas. Roma.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Agricultura Mundial Hacia los Años 2015/2030-Organización Mundial de la Salud. [en línea] (2015) (Italia) [Consulta: 2017-03-007]. Disponible en: <http://www.fao.org/.htm>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2009a). Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. NIMF N ° 5. Glosario de Términos Fitosanitarios. Roma - Italia. Consultado el 09 de marzo de 2017. Disponible en: <http://www.cosave.org/sites/default/f.pdf>.
- Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua (FUNICA). (2015). *Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos*. (I. A. UNA, Ed.) Recuperado el 01 de marzo de 2017, de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc//.PDF>.
- France, A., Cisternas, E & Urtubia, I. (2016). Instituto de Investigaciones Agropecuarias Centro Regional de Investigación la Cruz - Ministerio de Agricultura. Hongos Entomopatógenos. Microorganismos benéficos para

- el control de *A.nodipennis*. Informativo INIA La Cruz 34. Valparaíso, Chile.
- Gálvez, A., Mendoza, F., Rubén Monroy, R., & Gómez-Vázquez, A. (2015). Control de la garrapata *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* con *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio. 5to Simposium de Investigación Multidisciplinaria. 6to Encuentro Nacional de Investigación Científica. 28, 29 y 30 de octubre 2015. Pp. 11-15
- Gallegos, G., Cepeda, M., & Olayo, R. (2004). *Entomopatógenos* (Vol. Primera edición). México, México: Trillas.S.A.
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y.Wang, C. (2011). Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS Genet, 7(1), e1001264. Doi:10.1371/journal.pgen.1001264.
- García I, del Pozo E, Méndez A, Céspedes Y. (2006). Producción de biomasa de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, aislamiento Nr-003, en diferentes medios de cultivos líquidos, con agitación. Rev Protección Veg. 21(3):173-177.
- García, J. F., Machado, P. S., & Postali, J. R. (2007a). Laboratory rearing technique of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). Revista Scientia Agrícola, 64(1), 73-76. January to February.
- García, M; Cappello, S; Leshner, J & Molina, R. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Ensayo. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Pp. 21.
- García, A., Bustillo, A., Castro, U., & Arenas, Y. (2012). Selección de hongos entomopatógenos para controlar salivazos (Hemíptera: Cercopidae) de la caña de azúcar en Colombia. Revista Colombiana de Entomología, 38(2), 252-259.
- Garza, P. (2008). Cambios fisiológicos de *Beauveria bassiana* (bals) Vuill. como respuesta a la composición atmosférica. Iztapalapa, Mexico.
- Glare, T.R. (2004). Biotechnological potencial of entomopathogenic fungi. En: Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications (Arora DK, ed). Pp. 79-90. Marcel Dekker Inc, New York.

- Gerónimo-Torres J., De La Cruz M., Pérez M., Pérez A., Ortiz F & Cappello S. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 42 (1): 28-35 (Enero - Junio 2016).
- Gerwick, B.C., Sparks, T.C.(2014). Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest Management Science* 70, 1169-1185.
- Goettel, M. S. (1991). Environmental impacts and safety of fungal biocontrol agents. En C. (. En Lomer C. J. and Prior (Ed.), *Biological Control of Locust and Grasshoppers. Proceedings of Workshop Held at the International Institute of Tropical Agriculture*, (págs. 297-361.). Cotonou, Benin, 29 April – 1 May.
- Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T.(2005). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. En: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.) *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 361-405.
- Goettel, M.S., Eilenberg, J. & Glare, T. (2010). Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. In *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. Elsevier, p. 32.
- Gómez, L. A., Hincapié, L. A., & Marín, M. E. (2007). El salivazo de la caña de azúcar *Mahanarva bipars*. Cenicaña (Colombia), Serie divulgativa N°. 10.
- Gómez, L. (2010). Conferencia la problemática con los pesticidas en Colombia. <http://www.es.lapluma.net/index.php?option=com-la-prt.420>.
- Gómez, P., Mendoza, J., & Gualle, D. (2014). Biología, dinámica poblacional y enemigos naturales del salivazo, *Mahanarva trifissa* (Jacobi) (Hemiptera, Cercopidae), de la caña de azúcar. Guayaquil, Ecuador: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Ecuador. Carta Informativa no. 16 (1).
- González, R., Molina, O., & Lezama, G. (1997). *Biología de nemátodos entomopatógenos y limitación de aplicación*. México, México: SMCB.
- Guerrero, J., Carrillo, R., & Aguilera, A (1999). Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium* var

- anisopliae* asociado a las larvas de escarabaeídos y curculionidos. Chile: Agro Sur. Pp. 13.
- Gurulingappa, P. *et al.* (2010). Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control*, 55(1), pp.34–41. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10526-009-9388-8>.
- Grace, J & Jaronski, S. (2005). Solid Substrate Fermentation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Workshop February 16, 17,18, 2005. USDA-ARS Northern Plains Agricultural Research Laboratory. Pp. 2-4.
- Guedez, (2014). Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo Venezuela. University of the Andes (Venezuela).
- Han, P.F., Jin, F.L., Dong, X.L., Fan, J.Q., Qiu, B.L., Ren, S.X., (2013). Transcript and protein profiling analysis of the destruxin A-induced response in larvae of *Plutella xylostella*. *PLOS ONE* 8, e60771.
- (Hernández, V. (2015). Patogenicidad y Virulencia del Hongo *Beauveria bassiana* Contra la Chinche de las Crucíferas *Bagrada hilaris* Bajo condiciones de Laboratorio. Pp. 13-15.
- (Hernández, G. (2010). Cereales y productos derivados. P. 18.
- Herrera, M. &. (2005). Control de la Calidad para un Laboratorio de Microbiología. San José., Costa Rica. Recuperado el 11 de 01 de 2015, de <http://www.scielo.sa.cr/pd.pdf>.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon & *et al.* (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111,
- Honig, P. (1974). Principios de Tecnología Azucarera. México.: Compañía Editorial Continental. 2da Edición. Pp: 253. Recuperado el 22 de septiembre del 2016. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>.
- Hoog, G.S. (2000). Atlas of clinical fungil. 2da Edición.
- Hu, X., Xiao, G., Zheng, P., Shang, Y., Su, Y., Zhang, X., Liu, X., Zhan, S., St. Leger, R.J., & Wang, C. (2014). Trajectory and genomic determinants of fungal pathogen speciation and host adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16796-16801.

- Humber, R. A. (2012). Identification of entomopathogenic fungi. En: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (Second Edition) (pp. 151-187).
San Diego: Academic Press.
- Humber R.A. (2012). Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*. 120: 477-492.
- Ibarra, G., Moya, G., & Berlanga, A. (2005). Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (DeLong y Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae). *Folia Entomol. Mex.*, 44(1), 1-6.
- Ibrahim L., Laham L., Touma A and Ibrahim S.(2015). Mass Production, Yield, Quality, Formulation and Efficacy of Entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* Conidia. *British Journal of Applied Science & Technology* 9 (5): 427-440, 2015, Article no.BJAST.2015.282.ISSN: 2231-0843. SCIENCEDOMAIN International. www.sciencedomain.org.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M and Strasser H. (2001). Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pests. In: But, TM, C. Jackson and N. Magan, (Eds.). *Fungi as Biocontrol Agent* CAB International, Wallingford, UK. Pp 23-69.)
- Iskandarov, U., Guzalova, A., & Davranov, K.(2006). Effects of Nutrient Medium Composition and Temperature on the Germination of Conidia and the Entomopathogenic Activity of the Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. Rusia. 42(1): 72-76p.
- Jackson, M. M. (1997). Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. En *Mycological Research*. (págs. 101, 35–41.).
- Jandricic, S. E., Filotas, M., Sanderson, J. P., Wraight, S. P. (2014). Pathogenicity of conidia-based preparations of entomopathogenic fungi against the greenhouse pest aphids *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, and *Aulacorthum solani* (Hemiptera: aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 11, N° 5. Pp. 34-46.
- Jaramillo, L. (2012). Evaluación y validación de mezclas de *B. bassiana* (Blasamo) Vuillemin y *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para el

- control de la broca del café en fruto infestados caídos al suelo. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Pp.11).
- Jaronski, S.T., (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55, 159-185.
- Jaronski, S & Jackson, M. (2012). Mass Production of Entomopathogenic Hypocreales. En *Manual Of Techniques In Invertebrate Pathology*. (Second Edition. ed.). USA: Lawrence A. Lacey. IP Consulting International Yakima, Washington, USA. Publicado por Elsevier Ltd. Pp. 254-281.
- (Jenkins, N. E & Goettel, M. S (1997). Methods for mass production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. In M. S. Goettel & D. L. Jahnson. *Microbial Control os Grass-hoppers and Locusts*. *Men. Ent. Soc. Canada*, 171, 37-48.
- Jitendra, M., Kiran, D. J., Ambika, K., Priya, S., Neha, K., & Sakshi, D. (2012). Biomass Production of Entomopathogenic Fungi using various Agro Products in Kota Region, India. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(4), 12-16.
- Jones, G.G. (1973). Pyrethrum production. Pyrethrum, the natural insecticide. Pp. 17.
- Kamp, A.M., y Bidochka, M.J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology* 35, 74-77.
- Karanja, L., Phiri, N & Oduor, G. (2016). Effect of different solid substrates on mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* entomopathogens. Artículo ResearchGate. Centre for Agricultural Bioscience International. Nairobi, Kenya
- Kepler, R. M., Sung, G. H., Ban, S., Nakagiri, A., Chen, M. J., Huang, B., Li, Z., & Spatafora, J. W. (2012). New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. *Mycologia*, 104(1), 182–197.
- Keller, S. (2007). Arthropod-pathogenic Entomophthorales from Switzerland. III. First additions. *Sydowia* 59, 75-113.
- kim, k., & kim, y. (2002). Abscission layer formation as a resistance response of Peruvian apple cactus against *Glomerella*.

- Kol-Maimon H, Ghanim M, Franco JC, Mendel Z. (2014). Evidence for gene flow between two sympatric mealybug species (Insecta; Coccoidea; Pseudococcidae). PLoS ONE.; 9(2): e88433.
- Kruger, R., Posadas, J., Angulo, M., Mini, J., & Leucuona, R. (2014). Solid Substrate Production and Formulation of an Isolate of *Metarhizium anisopliae* for Biological Control of Steam Bug *Tibraca limbativentris*. (32 (7)), 1242.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 1-41.
- Lasso, B. L., Cruz, E. G., & Haro, P. R. (2010). Zonificación agroecológica de tres cultivos estratégicos (Maíz *Zea mays* L., Arroz *Oryza sativa* L., Caña de azúcar *Saccharum officinarum* L.) en 14 cantones de la cuenca del Río Guayas. (pp. 1-14). Ecuador: Centro de Levantamientos Integrados de Recursos Naturales pormSensores Remotos (CLIRSEN).
- Lösch, A., Hutwimmer, S. and Strasser, H. (2010) Carbon utilization pattern as a potential quality control criterion for virulence of *Beauveria brongniartii*. *J Invertebr Pathol* 104, 58–65.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P. Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology* 46, 667 702.
- Lópes, R.B. *et al.* (2015). The fungistatic and fungicidal effects of volatiles from metathoracic glands of soybean-attacking stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) on the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, pp.77–85. Available at: <http://elsevier1500>.
- López, D.C. & Sword, G.A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm *Bibliografía* 83(*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89(August), pp.53–60. Available at <http://www.sciencedirect.com>.
- Lozano-Tovar, M.D., Garrido-Jurado, I., Lafont, F., & Quesada-Moraga, E. (2015). Insecticidal Activity of a Destruxin- Containing Extract of *Metarhizium brunneum* Against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 108, 462-472.

- Madaleno, L. L. (2006). Infestação de *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1854) e controle químico na qualidade da matéria-prima e clarificação do caldo de cana. (Tesis de Maestría). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jabotical, São Paulo, Brasil.
- Mahdavi, V., Saber, M., Rafiee, H., & Mehrvar, A. (2013). Susceptibility of the *Hymenopteran parasitoid*, *Habrobracon hebetor* (Say) (Braconidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* Sorokin. J. J. Biol. Scien., 6, 17-20.
- Malpartida, J; Narrea, M; & Dale, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. Ecología Aplicada. 12(2): 75-81.
- Marín, P. *et al.* (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Cenicafé, Colombia.
- Matthew, J. S., & Khan, A. (2013). Growth kinetics and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates against *Bemisia tabaci* Grennadius (Homoptera: Aleyrodidae). JBiopest, 6 (2), 160-164.
- Masoud, L. B. (2013). Mass Production Of Entomopathogenic Fungi *Beauveria Bassiana* (Balsamo) By Using Agricultural Products Based On Liquid-Solid Diphasic Method For Date Palm Pest Control. (I. 2.-6. Journal., Ed.) *International Journal of Agriculture and Crop Sciences. IJCS.*, 5-19. Recuperado el 16. de 3 de 2015, de www.ijagcs.com.
- Mazet, I., & Vey, A., (1995). Hirsutellin-A, a toxic protein produced in-vitro by *Hirsutellathompsonii*. Microbiology 141, 1343-1348.
- Méndez, M., & Rosas, H. (1998). Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* como una alternativa de control de termitas, en Memoria del siglo XXI. *Congreso Nacional de Control Biológico*. Tamaulipas, México, México.
- Mendoza, J. (2004). Guía para el reconocimiento y manejo de insectos plagas y roedores de la caña de azúcar, en el Ecuador. Guayaquil, Ecuador: Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Ecuador. Publicación técnica N°.2.
- Mendoza, J. (2012). Entomólogo del CINCAE (Centro de Investigaciones de la Caña de Azúcar del Ecuador) Informe de identificación taxonómica.

- Mendoza, J., Gualle, D., & Gómez, P. (2013). Plagas potenciales: una amenaza para el cultivo de la caña de azúcar en Ecuador. En Memorias del III Congreso de la Caña de Azúcar, sus Derivados y Bioenergía, realizado por la Asociación Ecuatoriana de Tecnólogos Azucareros, Guayaquil, Ecuador.
- Mendonça, A. (2009). *Cigarrinhas* da cana-de-açúcar, controle biológico. Maceió, BR. Livroceres. p. 165-179.
- Monteros A. (2016). Rendimientos de café grano seco en el Ecuador. Dirección de Análisis y Procesamiento de la Información, Coordinación General del Sistema de Información Nacional Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca Quito, Ecuador. Agosto, 2016.
- Merino, C. (2016). Evaluación de los Suplementos Nutritivos sobre Sustratos Sólidos para la Producción en Masa de *Beauveria Bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y *Metarhizium Anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Nativos en el Laboratorio. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica (RIIGEO), Vol.19 (N° 37), 25-32. doi:ISSN 1561-0888. Versión impresa y 1682-3087 versión electrónica.
- Molnár, I., Gibson, D.M., Krasnoff, S.B. (2010). Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. Natural Product Reports 27, 1241-1275.
- Monzon, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de plagas*(63). Costa Rica.
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua (en línea). Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos, CATIE. N°. 63: 95-103. Consultado el 30 de mayo 2017. Disponible en: <http://www.bio-HongoEntomopatogenos.pdf>
- Mongkolwai T, Vatanabot U, Prompibon P, Bnayat C, Wiwat C & Bhurniratana (2008). A. Production of *Nomuraea rileyi* by solid substrate and submerged fermentations. Disponible en: <http://www.aseanbiotechnology>. (Consultado: 18 de septiembre 2016).

- Mustafa U and Kaur, G. (2009). Radiación UV-B y estrés térmico provoca respuesta de crecimiento variable de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. India: s-n.
- Mustafa, U and Kaur, G. (2009) Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. African Journal of Agricultural Research Vol. 3 (10). Pp. 922-930. ISSN 1991-637X © 2008 Academic Journals. Full Length Research Paper.
- Nussenbaum, A. (2014). Mantenimiento de hongos entomopatógenos. *Aislamientos de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae virulentos para el control del picudo del algodonoero, Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae)*. Argentina, Buenos Aires. Recuperado el 11 de 01 de 2015, de http://digital.bl.fcen.uba28=Tesis_5511_Nussenbaum.
- Obando, J. A., Bustillo, A. E., Castro, U., & Mesa, N. C. (2013). Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). Revista Colombiana de Entomología, 39(1), 26-33.
- Oerke, E.C.(2006). Crop losses to pests. Journal of Agricultural Science 144, 31-43.
- Oliveira, D.G.P. et al. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. Journal of Microbiological Methods, 119, pp.44–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.021>.
- Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Santiago-Alvarez, C., & Quesada-Moraga, E., (2009). Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the *Mediterranean fruit* fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Pest Management Science 65, 1130-1139.
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C., Quesada-Moraga, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 105, 270-278.

- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N. O., Quesada-Moraga, E. (2013). Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 23, 1199-1212.
- Ortiz-Urquiza, A., Keyhani, N.O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4, 357-374.
- Pajares, M. (2013). Investigación I. Profesora de la Facultad de Posgrado de la Facultad de Geología, Minas, Minerología y Geográfica de la Universidad Mayor de San Marcos.
- Paladini, A., & Cryan, J. R. (2012). Nine new species of Neotropical spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae: Ischnorhininae). *Revista Zootaxa*, 3519, 53-68.
- Parween T., Jan S., Mahmooduzzafar S., Fatma T & Siddiqui ZH. (2013). Selective effect of Pesticides on Plant. *Crit Rev Sci Nutr.* (56):160-79.
- Pattemore, J., Hane, J. K., Williams, A. H., Wilson, B. A., Stodart, B. J., & Ash. G. J. (2014). The genome sequence of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC Genomics*, 15:660.
- Pariona, N., Castellanos, P., León, E., (2007). Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp., sobre *Schistocerca piceifrons* peruviana (Lynch Arribalzaga, 1903). *Rev. Perú. Biol.* 14 (2) pp. 2.
- Pedras, M.S.C., Zaharia, L.I., Ward, D.E. (2002). The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* 59, 579-596.
- Pell, J.K., Hannam, J.J., Steinkraus, D.C. (2010). Conservation biological control using fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55, 187-198. 53 – 257.
- Pereira de Lyra, M., Bastos da Silva, M. L., Cavalcanti, V. A., & Mergulhao, A. (2012). Characterization of *B.* using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(101), 16635-16639.
- Petrenko, O. (2005). *Estudio de Algunas Características de las Cepas de Levadura y de su Rendimiento Celular Utilizando un Medio de cultivo a Base de Suero Láctico*. Recuperado el 07 de octubre del 2016. Disponible en: <http://www.ub.edu.ar/inv.pdf> (2014-6-26. 0:01).

- Peck, D. C., Rodríguez, J., & Gómez, L. A. (2004). Identity and first record of the spittlebug *Mahanarva bipars* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopidae) on sugarcane in Colombia. *Florida Entomologist*, 87(1), 82-84.
- Pérez, J. (2014). *Fundamentos Filosóficos de la Educación Ambiental para los Decisores*. Recuperado el 07 de octubre del 2016. Disponible en: <http://www.ilustrados.com/tema/12129/Fundamentos-filosoficos-educacion-ambiental-para-decisores.html>.
- Pierik, R. (1987). *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers.
- Pereira de Lyra, M., Bastos da Silva, M. L., Cavalcanti, V. A & Mergulhao, A. (2012). Characterization of *Metarhizium anisopliae* using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(101), 16635-16639.
- Pik, K. H., Choon, J. B., Kadir, J., & Amartalingam, R. (2009). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) Isolates and their effects on Subterranean Termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(4), 289-297.
- Polit, M. (2013). *Desarrollo de una Colada Fortificada con Vitamina A, Zinc y Hierro para el Desayuno Escolar de Niños entre 3 a 4 años 11 meses. (Tesis de Grado)*. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.e/230000.pdf>.
- Portela, G. L. (2008). Dinamica populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) e *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) e infestacao de diferentes variedades de cana-de-acucar por *Diatraea* spp. No Município de UNIAO-PAUI-BRASIL. (Tesis de Maestría). Universidade Federal do Piauí, Estado do Piauí, Brasil.
- Portela, G. L., Pádua, L. E., Branco, R. T., Barbosa, O., & Silva, P. R. (2010). Flutuação populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera – Crambidae) em cana-de-açúcar no Município de União-PI. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5(3), 303-307.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodriguez, S., & De La Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. 31(12), 856.

- Quesada-Moraga, E., Carrasco-Díaz, J. A., & Santiago-Álvarez, C., (2006^a). Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 130, 442-452.
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A., (2003). Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of in vivo and in vitro passage on these factors. *Biocontrol Science and Technology* 13, 323-340.
- Quesada-Moraga, E., Carrasco-Díaz, A., & Santiago-Álvarez, C. (2006). Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 130, 442-452.
- Quesada-Moraga, E., Navas-Cortes, J.A., Maranhao, E.A.A., Ortiz-Urquiza, A., Santiago-Alvarez, C. (2007). Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* 111, 947-966.
- Quesada-Moraga, E., & Santiago-Álvarez, C. (2008). Hongos Entomopatógenos. In: Urbaneja, A., Jacas, J. (Eds.), *Control biológico de plagas*. Phytoma y Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, Navarra, pp. 98-120.
- Quesada-Moraga, E., Yousef, M., Ortiz, A., Ruiz-Torres, M., Garrido-Jurado, I., & Estevez, A. (2013). *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) Wound Dressing for the Control of *Euzophera pinguis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* 106, 1602-1607.
- Quesada-Moraga, E., Lopez-Diaz, C., & Beatriz Landa, B. (2014^a). The Hidden Habit of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: First Demonstration of Vertical PlantTransmission. *PLOS ONE* 9, e89278.
- Quesada-Moraga E., Herrero N., & Zabalgogezcoa Í. (2014b). Entomopathogenic and Nematophagous Fungal Endophytes, In: Verma,V.C., Gange, A.C. (Eds.) *Advances in Endophytic Research*. Springer, India pp. 85-99.
- Quiroz, C., & Tréllez, S. (1992). *Manual de Referencia Sobre Conceptos Ambientales*. Bogotá.: SECAB, Fundación Konrad Adenauer.

- Qazi SS, Khachatourians GG. (2008). Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beauveria bassiana*. *Arch. Microbiol.* 189: 589–596.
- Raimbault, M. (1998). General and Microbiological aspects of Solid Substrate Fermentation. En *International Traiing Course On Solid-State Fermentation. Proceedings.* (págs. 1-20.). Curitiba, Brazil.
- Rai, D., Updhyay, V., Mehra, P., Rana, M., & Pandey, A. K. (2014). Potential of entomopathogenic fungi as biopesticides. *Ind. J. Sci. Res. and Tech.*, 2(5), 7-13.
- Ravensberg, W.J. (2015). Commercialisation of microbes: Present situation and future prospects. In: Lugtenberg, B. (Ed.) *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing. pp. 309-317.
- Rodríguez, J. C., Peck, D. C., & Canal, N. A. (2002). Biología comparada de tres especies de salivazo de los pastos del género *Zulia* (Hemóptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 28(1), 17-25.
- Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O., Balachander, M., & Bai, N. S. (2010). *Metarhizium* based mycoinsecticides for forest pest management. *Journal of Biopesticides*, 3(2), 470-473.
- Ramanujam, B., Rangeshwaran, R., Sivakmar, G., Mohan, M., & Yandigeri, M. S. (2014). Management of Insect Pests by Microorganisms. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 80 (2), 455-471.
- Ramanuj, P. (2015). Isolation, identification and mass production of soil microbes and their potential utility for biocontrol of pest Madhya Pradesh. *Patel UJPBS*, 03 (01), 1-4.
- Ramanujam, B., Rangeshwaran, R., Sivakmar, G., Mohan, M., & Yandigeri, M. (2014). Management of Insect Pests by Microorganisms. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 80 (2), 455-471.
- Ramírez, S. (2016). Optimización del medio de cultivo para *Metsrizium anisopliae*. P.10.
- Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O., Balachander, M., & Bai, N. S. (2010). *Metarhizium* based mycoinsecticides for forest pest management. *Journal of Biopesticides*, 3(2), 470-473.

- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L., Humber, R.A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycology* 103, 1055-1073.
- Resquín-Romero, G., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E. (2015). Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 92, 101-110.
- Resquín, D^a. G. (2016). Combinación de diferentes estrategias de aplicación de hongos entomopatógenos para el control de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). (Tesis de Doctoral). Universidad de Córdoba. Pp. 10, 21-23.
- Restrepo, J. (2007.). *Abonos Orgánicos Fermentados* (Vol. 1). Cali, Colombia: Feriva. S.A.
- Rodríguez, J.; Peck, D. (2007). Biología y hábitos de *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae) en condiciones de casa de malla. *Revista Colombiana de Entomología* 33 (1): 31-35 (2007). Consultado: 05 de junio del 2017. Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v33n1/v.pdf>
- Rodriguez, R.J., White, J.F., Jr., Arnold, A.E., & Redman, R.S., (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182, 314-330.
- Rossoni, C., Kassab, S. O, Loureiro, E., Pereira, F. F., Costa, D., Barbosa, R & Zanuncio, J. (2014). *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) are Compatible with *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Florida Entomologist*, 97(4), 1794-1804.
- Roy, H.E., Brodie, E.L., Chandler, D., Goettel, M.S., Pell, J.K., Wajnberg, E., Vega, F.E. (2010). Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55, 1-6.
- Rustiguel, C. B., Joao, A., & Guimarães. (2012). Optimization of the Chitinase Production by Different *M. anisopliae* Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD. *Advances in Microbiology* (2), 268-276.

- Sabouraud, R. (Octubre de 2015). Procedimientos de control de calidad. *BBL Sabouraud Dextrose Agar y BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol L007492*(12).
- Scheepmaker, J.W.A., Butt, T.M. (2010). Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and inaccordance with EU regulations. *Biocontrol Science and Technology* 20, 503-552.
- Shah, F.A. and Butt, T.M. (2005) Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett* 250, 201–207.
- Shapiro-Ilan D, Reilly C C, & Hotchkiss M W. (2011). Comparative impact of artificial selection of fungicide resistance on *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Environ. Entomol.* 40 (1): 59-65.
- Scholte, E. J. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of insecto Science*. Sharma, K. (2004). Bionatural Mangement of Pests in Organic Farming. *Agrobios Newsl.* Vol.2. Pp.296-325.
- Schapovaloff, M. E., Alves, L. F., Fanti, A. L., Alzogaray, R. A., & López, C. (2014). Susceptibility of adults of the cerambycid beetle *Hedypathes betulinus* to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Insect Science*, 14(127).
- Shahid, A. A., Rao, Q. A., Bakhsh, A., & Husnain, T. (2012). Entomopathogenic fungi biological controllers: new insights into their virulence an pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64(1). Pp.21-42.
- Sahayaraj, K., & Namachivayam, S. K. R. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *Africa J. Biotechnol.*, 7, 1907-1910.
- Safavi, S. A., F. A. Shah, A. K. Pakdel, G. R. Rasoulia, A. R. Bandani, & T. M. Butt.(2007). Effect of nutrition on growth and virulence off the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (en línea). *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 116-123p. Consultado el 30 de mayo 2017. Disponible en: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/270/1/116.full>.
- Statgraphics® Plus. Versión 5.1. (2015). Per Statistical Graphice Corp. en CD.

- SENASA. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Ministerio de Agricultura, P. (03 de 08 de 2014). *Ministerio de Agricultura SENASA Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Perú. HEP. Procedimiento para la preparación de hongos entomopatógenos. 03 de agosto del 2014.*
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1981). *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research.* 2nd Ed. WH Freeman and Company. San Francisco. 859.
- Sung, J.-M., Lee, J.-O., Humber, R.A., Sung, G.-H & Shrestha, B. (2006). *Cordyceps bassiana* and Production of Stromata in vitro Showing *Beauveria* Anamorph in Korea. *Mycobiology* 34, 1. Doi:10.4489/MYCO.2006.34.1.001.
- Swan, H. &. (1990). Las Melazas y sus Derivados. *Revista Tecnología. Geplacea. N°. 19. España.*, 78-82.
- Smriti, V., Ravi, K and Brajesh, S. (2015). Mass Production of *Beauveria bassiana* (NCIN N°. 1300) Fungal Spores on Cereal Grains and Agro-Industrial Residues. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* ISSN: 0975-8585. P. 58-59.
- Speight, M.R., Hunter, M.D., Watt, A.D., (2008). *The Ecology of Insects: Concepts and Applications*, 2nd edn. Blackwell Scientific, Oxford, UK. *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. *Biocontrol* 53, 361-373.
- Skropek, A., Shah, F.A., Butt, T.M., (2008). Destruxin production by the entomogenous fungus.
- StatPoint, Inc. (2006). *Análisis Probit. Statgraphics.* Rev. 4/25/2007. Pp. 1-6.
- Taibon, J., Sturm, S., Seger, C., Strasser, H., Stuppner, H. (2015). Quantitative assessment of destruxins from strawberry and maize in the lower parts per billion range: combination of a QuEChERS-based extraction protocol with a fast and selective UHPLC-QTOFMS assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 5707-5713.
- Tangthirasunun, N., Poeaim, S., Soyong, K., Sommartya, P & Popoonsak, S. (2010). Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. *Journal of Agricultural Technology*, 6(2), 317-329.

- Taylor, L. (1984). Assessing and interpreting the spatial distributions of insect population. *Annual Review Entomology*, 29, 321-357.
- Téllez-Jurado A, Cruz-Ramírez MG, Mercado-Flores Y, Asaff-Torres A, *et al* (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev Mex Mic.*; 30: 73-80.
- Tiago, P. V., Souza, H. M., Moysés, J. B., Oliveira, N. T., & Lima, E. A. (2011). Differential pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and the Control of the Sugarcane Root Spittlebug *Mahanarva fimbriolata*. *Brazilian Archives of biology and technology*, 45(3), 435-440.
- Tiago, P. V., Oliveira, N. T & Lima, E. A. (2014). Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. *Ciência Rural*, 44(4), 645-651.
- Tonada, & H. K. Kaya. (1993). *Insect Pathology*. California, Estados Unidos: Academyc Press. P: 666.
- Torres, M., Cortez, M., Ortiz, F., Capello, S & De la Cruz, A. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 39 (1), 40-46.
- Toriello C., Montoya-Sansón E., Zavala-Ramírez M., Navarro-Barranco H., Basilio-Hernández D., Hernández-Velásquez V., & Mier T. (2008). Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). Xalapa: Revista mexicana de micología.
- Treviño, A. (2011). Manual de Microbiología. Conceptos y Práctica de Microbiología General. Palmira., Colombia. Recuperado el 11 de 01 de 2015, de <http://core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/11054932.pdf>.
- Tremblay, E. (1993). *Entomologia Applicata*, vol 4. Liguori, Ercolano/Napoli.
- Throne, J. E., Weaver, D. K., & Baker, J.E. (1995). Probit Analysis: Assessing Goodness-of-fit based on backtransformation and residuals. *J Econ Entomol* 88(5):1513-1516.
- Tseng, M.N., Chung, C.L., & Tzean, S.S., (2014). Mechanisms relevant to the enhanced virulence of a dihydroxynaphthalene-melanin metabolically engineered entomopathogen. *PLOS ONE* 9, e90473.

- Valadéz, J. (2011). Modulación de la Inmunidad innata del Lepidóptero plaga. *Trichoplusia ni* (Hübner) expuesto a *Bacillus thuringiensis*. Tesis de grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología.
- Valencia, C. (2015). Caracterización de aislamientos de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* asociados a insectos plaga de palma de aceite. 18. Bogotá, Colombia.
- Vargas, G.; Gómez, L. (2005). Evaluación del daño de *Diatraea sp.* en caña de azúcar y su manejo en el valle del río Cauca. CENICAÑA (Colombia), Serie Divulgativa, No.9. P.8. Consultado 05 de junio del 2017. Disponible en: http://miel.cenicana.org/pdf/carta_trimestral/ct2005/ct3y_p27-31.pdf
- Valle, S. (2015). Particularidades bioecológicas de *Mahanarva andigena* (Jacobi) como base para el manejo con *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin en la caña de azúcar *Saccharum spp.* híbrido en Pastaza, Ecuador. Tesis Doctoral. Pp. 72 y 73.
- Vargas, M. (2003). Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Sacardo) Petch y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). Tesis digital de UNMSM. Lima-Perú.
- Valero, C. (2016). A multidisciplinary approach to study virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* towards malaria mosquitoes. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL (2016). With references, with summary in English. ISBN 978-94-6257-854-8. DOI 10.18174/385465.
- Velásquez, B. (2016). Curso de Elaboración de Artículos Científicos. Departamento de Ingeniería Rural y Alimentaria . Universidad Politécnica de Valencia.
- Vélez A.P.E., & Montoya R.E.C. (2001). Supervivencia del hongo *Beauveria Bassiana* bajo radiación solar en condiciones de laboratorio y de campo. Cenicafé (colombia). 44(3): 111-112
- Vega, F.E. & Kaya, H.K. (2012). Insect Pathology, Academic Press.
- Ware, G.W., Whitacre, D.M., 2004. An introduction to insecticides. The Pesticide Book. Meister Pub. Willoughby, Ohio. Waterhouse D. F., Norris K. R. (1989). Biological Control: Pacific Prospects. Ed. Australian Centre for International Agricultural Research, Australia. P:118.

- Wraight S, Jackson M, Kock S. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as Biological Control Agent: Progress, Problems and Potential*. CAB International.
- Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2011). Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*, 157, 2904-2911.
- Yadav S, T. N. (2013). Mass Production Of Entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium Anisopliae* Using Rice As A Substrate By Diphasic Liquid-Solid Fermentation Technique. *International Journal of Advanced Biological Research.*, 3(3), 331-335. Recuperado el 17 de 3 de 2015.
- Yang,Y., Cai, S., Zheng, Y., Lu, X., Xu, X., & Han, Y. (2009). *Metarhizium taii* var. *chongqingensis* Nov., Anamorph of *Cordyceps chongqingensis* sp. Nov. Isolated from a low altitude area in Chongqing, China. *Curr. Microbiol*, 58, 635-641.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol* 17, 553-596. Doi:10. 080/09583150701309006.
- Zimmermann, G. (1992). Use of the fungus, *Beauveria brongniartii*, for the control of European cockchafers, *Melolontha* spp. in Europe. En: Jackson, T.A., Glare, T.R. (Eds.) *Use of Pathogens in Scarab Pest Management*. Intercept Limited, Hampshire, UK, pp. 199-208.

ANEXOS

Matriz de consistencia.

PROBLEMA DE INVESTIGACION	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES CLASIFICACION PROCESO DE OPERACIONALIZACION	MARCO TEÓRICO	HIPOTESIS CLASIFICACIÓN	TIPO DE INVESTIGACION
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVOS GENERAL	VARIABLE INDEPENDIENTE	CAPÍTULO 2	HIPÓTESIS GENERAL	
¿El aislamiento de cepas nativas y la adición de suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) y maíz (<i>Zea mays</i> L.) no generan incremento significativo en la producción y virulencia <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i> y <i>Mahanarva andigena</i> a nivel de laboratorio?	Determinar si el aislamiento de cepas nativas de diferentes fuentes y adicionar suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) y maíz (<i>Zea mays</i> L.) permite generar el incremento significativo de la producción y virulencia en <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Hypothenemus hampei</i> y <i>Mahanarva andigena</i> en el laboratorio.	Efecto de los sustratos nutritivos en la producción y virulencia de <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin y <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin.	<ul style="list-style-type: none"> • Marco filosófico o epistemológico de la investigación. • Fundamentación filosófica y legal. • Antecedentes de investigación. • Bases teóricas: • La agricultura y las plagas de insectos. • Plaga agrícola. • Broca del café <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari, 1887). 	El aislamiento de cepas nativas y la adición de suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) y maíz (<i>Zea mays</i> L.) generan incremento significativo en la producción y virulencia <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> sobre <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i> en el laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicada: persiguió fin específico. • Por la temporalidad: longitudinal, recolección de datos en períodos determinados.

Continúa.....

Matriz de consistencia

PROBLEMA DE INVESTIGACION	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES CLASIFICACION PROCESO DE OPERACIONALIZACION	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS CLASIFICACIÓN	TIPO DE INVESTIGACION
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VARIABLE DEPENDIENTE	CAPÍTULO 2	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	
1. ¿El aislamiento de cepas nativas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> a partir de diferentes fuentes y la determinación de sus características morfo fisiológicas y biológicas confirma su género y especie?	1. Determinar si el aislamiento de cepas nativas de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> a partir de diferentes fuentes y valorar las características morfo fisiológicas y biológicas permite la confirmación de su género y especies.	<ul style="list-style-type: none"> Las características morfo fisiológicas de las colonias de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>. Números de conidos por mililitros o gramos. Porcentajes de pureza de los cultivos de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> <i>in vitro</i> y en masa. 	<ul style="list-style-type: none"> Salivazo de la caña de azúcar (<i>Mahanarva andigena</i>. Jacobi). Manejo integrado de plagas y control biológico. Hongos Entomopatógenos. <i>Beauveria bassiana</i> (Bálsamo) Vuillemin 1912. 	1. El aislamiento de cepas nativas de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> a partir de diferentes fuentes y la determinación de sus características morfo fisiológicas confirma su género y especies.	Por el enfoque: Cuantitativo y alcance descriptivo (colección de datos correlacional (verificación de hipótesis).

Continúa.....

Matriz de consistencia

PROBLEMA DE INVESTIGACION	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES CLASIFICACION PROCESO DE OPERACIONALIZACION	MARCO TEÓRICO	HIPOTESIS CLASIFICACIÓN	TIPO DE INVESTIGACION
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VARIABLE DEPENDIENTE	CAPÍTULO 2	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	
2. ¿La adición de algunos de suplementos nutritivos: melaza, harina de amaranto y soya; leche en polvo y levadura al arroz (<i>O. sativa</i> . L) y maíz (<i>Z. mays</i> . L) generan un incremento significativo en la producción y virulencia <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> sobre la broca de café (<i>H. hampei</i> .) y el salivazo de la caña de azúcar (<i>M. andigena</i> .) en el laboratorio?	2. Determinar si la valoración de los parámetros de producción masiva de conidios con la adición de suplementos nutritivos al arroz (<i>Oryza sativa</i> . L.) y maíz (<i>Zea mays</i> . L) permite generar el incremento significativo en la producción de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en el laboratorio.	Porcentajes de la germinación de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> . Porcentaje mortalidad de <i>H. hampei</i> y <i>M. andigena</i> (patogenicidad y virulencia). CL ₅₀ de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff, 1879) Sorokin. • Medios de cultivo para aislar hongos entomopatógenos. • Sustratos sólidos para la producción de hongos entomopatógenos. • Producción en masa de hongos entomopatógenos. 	2. La valoración de parámetros de producción de conidios <i>in vitro</i> con la adición de suplementos nutritivos al arroz (<i>Oryza sativa</i> . L.) y maíz (<i>Zea mays</i> . L) generan incremento significativo en la producción de <i>Beauveria. Bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> en el laboratorio.	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff, 1879) Sorokin.

Continúa.....

Matriz de consistencia					
PROBLEMA DE INVESTIGACION	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES CLASIFICACION PROCESO DE OPERACIONALIZACION	MARCO TEÓRICO	HIPOTESIS CLASIFICACIÓN	TIPO DE INVESTIGACION
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	VARIABLE DEPENDIENTE	CAPÍTULO 2	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	
3. ¿La aplicación de un bioensayo utilizando los aislamientos nativos <i>Beauveria Bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre la broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i> ? Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (<i>Mahanarva andigena</i> . Jacobi), permite la valoración de la patogenicidad y virulencia en el laboratorio?	3. Determinar si la aplicación de un bioensayo utilizando los aislamientos nativos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre la broca del café (<i>H. hampei</i> . Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (<i>M. andigena</i> . Jacobi), permite la valoración de la patogenicidad y virulencia en el laboratorio. 4.	• TL ₅₀ de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre la <i>Hypothenemus hampei</i> y <i>Mahanarva andigena</i> .	• Determinación fisiológica de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> • Pruebas biológicas o bioensayos (patogenicidad y virulencia). • Definiciones básicas en el control microbiano.	3. La aplicación de un bioensayo utilizando los aislamientos nativos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre la broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i> . Ferrari) y el salivazo de la caña de azúcar (<i>Mahanarva andigena</i> . Jacobi), permite la valoración de la patogenicidad y virulencia en el laboratorio.	